

# **Psoriaasin transkriptomi**

Varpu Alenius

LK

Helsinki 01.03.2020

Tutkielma

[varpu.alenius@helsinki.fi](mailto:varpu.alenius@helsinki.fi)

Ohjaaja: FT, dos. Piia Karisola

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty <b>Lääketieteellinen tiedekunta</b>		Laitos – Institution – Department <b>Tutkimusohjelmayksikkö, HUMI</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Varpu Alenius</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Psoriaasin transkriptomi</b>			
Oppiaine – Läroämne – Subject <b>Lääketiede</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Syventävä tutkielma</b>	Aika – Datum – Month and year <b>01.03.2020</b>	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages <b>32 + 9</b>	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Taustatieto: Psoriaasi on tulehduksellinen ihosairaus, joka esiintyy tyypillisesi ihon selkeärajaisina, kohonneina, punoittavina ja hilseilevinä läiskinä. Psoriaasin esiintyvyys maailmanlaajuisesti on noin 2% ja sen muoto vaihtelee lievistä hengenvaaralliseen. Psoriaasin puhkeamiseen liittyvät sekä geneettinen pohja että altistavat ympäristötekijät, mutta tarkkaa patogeneesiä ei vielä tunneta. Tutkimuksen tavoitteena on lisätä tietoa psoriaasin patogeneesistä sekä siihen liittyvistä geeneistä transkriptomianalyysin avulla. Tavoitteena on myös erityisesti selvittää, eroaako psoriaasia sairastavan henkilön läiskätön iho terveen kontrollin ihosta ja jos eroaa, niin millä tavalla.</p> <p>Menetelmät: Tutkimme 303 näytettä, jotka kerättiin Helsingin yliopistossa, Kings college Londonissa sekä Heinrich-Heine-Universitaet Düsseldorfista. Vertailimme keskenään 108 psoriaatikon läiskien alueelta otettua näytettä ja 97 läiskättömältä iholta otettua näytettä sekä 98 terveestä kontrolli-ihosta otettua näytettä ja määritimme näille vertailuille eri tavalla ilmentyneet geenit bioinformaattisin menetelmin. Geeneille määriteltiin myös niitä vastaavat biologiset reitit erilaisilla ohjelmilla.</p> <p>Tulokset: Havaittiin, että läiskäinen iho eroaa voimakkaasti geenien ilmentymisen suhteen niin läiskättömästä kuin terveestä kontrolli-ihosta. Eri tavalla ilmentyneiden geenien reitit liittyivät erityisesti immunologiseen aktiivisuuteen sekä ihon erilaistumiseen. Myös läiskätön iho erosi terveestä kontrolli-ihosta immunologisen aktiivisuutensa suhteen. Biologisina reitteinä havaittiin useita interleukiini-17 liittyviä reittejä sekä solukuolemaan ja ihon erilaistumiseen liittyviä reittejä.</p> <p>Pohdinta: Tuloksemme vastasivat hyvin aikaisempien tutkimusten tuloksia ja biologiset reitit korostivat psoriaasille tyypillisiä patogeneenisia muutoksia. Tutkimuksen perusteella vahvistui erityisesti interleukiini-17 esiintyminen läiskättömässä ihossa, jonka merkityksen selvittäminen olisi tarpeellinen jatkotutkimuksen aihe.</p> <p>(209 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Skin, Psoriasis, Allergy and Immunology, Transcriptome, Computational Biology</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Helsingin yliopiston kirjasto – Helda / E-thesis (opinnäytteet), ethesis.helsinki.fi</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

1. Johdanto	1
2. Kirjallisuuskatsaus	2
2.1. Ihon rakenne ja toiminta	2
2.2. Immunologia	5
2.3. Psoriaasi	8
2.4. Ihotautilien tutkiminen transkriptomiikalla	11
3. Tutkimuksen tavoitteet	13
4. Aineisto	13
5. Menetelmät	15
5.1. eUTOPIA	15
5.2. Perseus	17
5.3. IPA, Panther ja Enrich R	17
5.4. Venny	18
5.5. INfORM	18
6. Tulokset	19
6.1. Eri tavalla ilmentyvät geenit	19
6.2. Biologiset reitit	21
6.3. Geenien interaktioverkostot	26
7. Pohdinta	27
Lähdeluettelo	33
Liitteet	36

# 1 Johdanto

Psoriaasi on tulehduksellinen ihosairaus, jonka esiintyminen väestössä on noin 2%. Iholla psoriaasi havaitaan läiskinä, jotka ovat selkeärajaisia, kohonneita, punoittavia sekä hilseileviä. Yleensä läiskät esiintyvät pienemmällä alueella, mutta vakavimmissa muodoissa ympäri kehoa. Psoriaasille tiedetään olevan perinnöllinen alttius ja se puhkeaa tyypillisesti infektion tai muun ulkoisen tekijän seurauksena. Kuitenkaan psoriaasin patogeneesiä ei tunneta tällä hetkellä kunnolla, vaikka tutkimuksessa on edistytty.

Psoriaasin yhteydessä esiintyy erilaisia liitännäissairauksia. Tällaisia tauteja ovat mm. metabolinen oireyhtymä, diabetes sekä sydän- ja verisuonisairaudet. Psoriaasia sairastavilla havaitaan myös lisääntyneitä mielenterveyden ongelmia kuten masennusta. Psoriaasin patogeneesin tarkempi selvittäminen ja uusien hoitomuotojen kehittäminen olisi myös näiden sairauksien ennaltaehkäisyn vuoksi erittäin tärkeää.

Transkriptomitutkimuksella pyritään selvittämään, mitkä geenit ovat aktiivisia sairaudessa ja miten niiden ilmentyminen eroaa eri ryhmien välillä. Tulosten avulla voidaan havaita geenien kytköksiä tiettyihin biologisiin reitteihin, kuten immunologiseen aktiivisuuteen, ja ohjata näin tutkimusta jatkossa oikeaan suuntaan.

Tässä tutkimuksessa pyritään yhdistelemään erilaisia menetelmiä kuvaamaan psoriaasin transkriptomia ja vertailemaan psoriaatikon läiskäistä ihoa läiskättömään sekä terveeseen kontrolli-ihoon. Tavoitteena on selvittää, millä tavalla nämä eroavat toisistaan ja mihin eroavaisuudet liittyvät. Tavoitteena on myös tarkastella, miten psoriaatikon ulkoisesti terve läiskätön iho eroaa terveestä kontrollista ja selvittää, minkälaista tietoa tulokset antavat psoriaasin patogeneesistä.

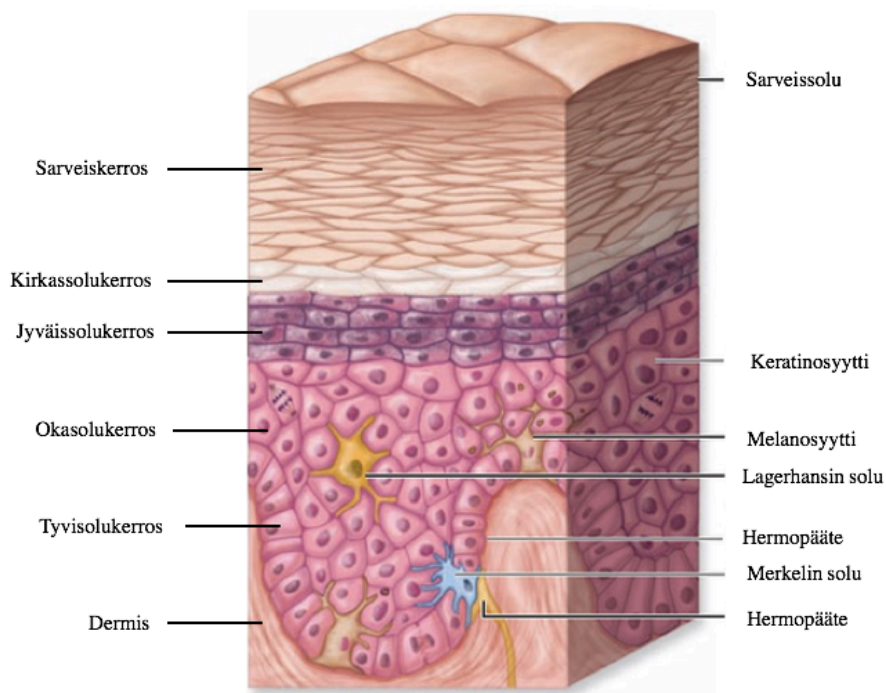
## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Ihon rakenne ja toiminta

Iho on kehomme suurin elin ja sen ulommaisin osa. Sen monimuotoinen rakenne mahdollistaa erilaisista tehtävistä huolehtimisen: se suojaa meitä mekaaniselta rasitukselta, säteilyltä ja patogeeneilta, ylläpitää homeostaasia, säätelee kehon lämpötilaa, välittää tuntoaistia sekä osallistuu mm. D3-vitamiinin tuottamiseen. Varsinainen iho jaetaan kahteen osaan: orvasketeen (epidermis) ja verinahkaan (dermis). Näiden alla sijaitsee rasvasta muodostuva ihonalaiskerros (subcutis) (1, 2). Ihon rakenteeseen kuuluvat myös ihokarvat sekä erilaiset rauhaset (1).

Orvaskesi on keratinosyyttien muodostamaa kerrostunutta levyepiteeliä. Se on yleensä noin 75-150 µm paksuinen, mutta paksuus vaihtelee alueen mukaan. Esimerkiksi jalkapohjien ja kämmenten ihon tulee kestää jatkuvaa kulutusta, joten orvaskeden paksuus voi näissä olla jopa 0,4-0,6 mm. (3)

Orvaskesi voidaan jakaa neljään kerrokseen (kuva 1), jotka muodostuvat, kun keratinosyytit erilaistuvat siirtyessään lähemmäs kohti ihon pintaa. Erilaistuminen kestää keskimäärin 50-75 päivää, mutta alueilla, joissa orvaskesi on paksumpi, erilaistuminen voi kestää 3-4 kuukautta. Pohjimmaisena erotetaan jakautuvia kantasoluja sisältävä tyvisolukerros, stratum basale. Tämän päällä sijaitsee erilaistuvista keratinosyyteistä muodostunut 5-10 solukerroksen paksuinen okasolukerros, stratum spinosum. Jyväissolukerroksessa, stratum granulosum, keratinosyyttien sytokeratiinisäikeet kimppuuntuvat ja muodostavat mikroskoopilla havaittavia keratohyaliinijyväsiä solun sisälle. Orvaskeden ulommainen kerros on sarveiskerros, stratum corneum, joka koostuu tumattomista keratinisoituneista sarveissoluista, korneosyyteistä. Solujen sytokeratiinisäikeet sekä niihin liittyvät proteiinit muodostavat soluun sarveiskuoren. Tämä kuolleiden solujen kerros hilseilee kulutuksessa ihon pinnalta. Paksuilla ihoalueilla jyväissolukerroksen ja sarveiskerroksen välissä voidaan erottaa ohut, kuolleista keratinosyyteistä muodostunut kuudes kerros: kirkassolukerros, stratum lucidum. (1, 3)



**Kuva 1. Kaavakuva ihon rakenteesta.** (Mukaillen Jungueira basic histology text and atlas 13<sup>th</sup> edition) (1)

Orvaskeden rakenteeseen kuuluu keratinosyyttien lisäksi myös muita soluja. Tyvikerroksessa sijaitsevat melanosyytit sekä Merkelin solut. Melanosyytit osallistuvat D3-vitamiinin valmistukseen sekä niiden tuottamat melaniinijyvät toimivat suojana UV-säteilyä vastaan. Merkelin solut toimivat mekanoreseptoreina kevyelle kosketukselle ja niitä on erityisen paljon esimerkiksi sormenpäiden iholla. Ihon dendriittisolut, Lagerhansin solut, sijaitsevat pääasiassa okasolukerroksessa ja esittelevät antigeeneja T-soluille. (1)

Koska ihon päätehtäviin kuuluvat suojaus ja homeostaasin ylläpito, solujen väliset liitokset ovat erittäin tärkeä osa sen rakennetta. Tyvisolukerroksen solut ovat kiinnittyneet basaalipinnoiltaan hemidesmosomeilla kerroksen alapuolella sijaitsevaan tyvikalvoon ja lateraali- sekä apikaalipinnoiltaan desmosomeilla ympäröiviin soluihin. Sidosten määrä on suurempi ylemmissä kerroksissa keratinosyyttien erilaistuessa. Okasolukerroksen runsaat desmosomit tukevat ihon rakennetta. Jyväissolukerroksen solut ovat kiinnittyneet toisiinsa tiiviillä liitoksilla ja erilaistuvat solut aloittavat sarveiskerroksen sarveiskuoren muodostuksen. Tiiviit liitokset sekä sarveiskuori muodostavat suojan, joka estää veden ja

ravintoaineiden haihtumista sekä hankaloittaa ulkopuolisten molekyylien siirtymistä elimistöön. (4-6) Orvaskeden alapuolella sijaitseva tyvikalvo sekä siihen liittyvät rakenteet muodostavat tyvikalvovyöhykkeen, joka liittyy orvaskeden verinahkaan. (3)

Verinahan paksuus vaihtelee sijainnin mukaan. Selän alueella se on paksuin, noin 4 mm. Verinahka koostuu lähinnä sidekudoksesta ja sitä muodostavista fibroblasteista. Se voidaan jakaa kahteen kerrokseen: papillaarikerrokseen ja retikulaarikerrokseen. Papillaarikerros koostuu löyhemmästä kollageeni I:stä ja III:sta sisältävästä sidekudoksesta. Kerroksen soluja ovat fibroblastit, syöttösolut, makrofagit sekä muut leukosyytit. Papillaarikerros tukee kollageeni VII:stä muodostuneilla fibrilleillään orvaskeden ja verinahan liitosta. Retikulaarikerros on edellistä paksumpi, sen sidekudos on tiiviimpää ja koostuu pääasiassa kollageeni I:stä. Elastiinisäikeet tuovat kudokselle joustavuutta. Retikulaarikerroksessa on myös papillaarikerrosta vähemmän soluja. (1)

Verinahka huolehtii ihon ravintoaineiden saannista. Verinahan kerrosten välille muodostuu suuremmista suonista lähtöisin oleva verisuonipunos, josta jokaiseen papillaarikerroksen papillaan lähtee yksi valtimo ja sitä vastaava laskimo. Nämä muodostavat oman kapillaariverkostonsa orvaskeden ja verinahan rajalle. Suonet muodostavat myös anastomooseja, suntteja, joilla voidaan säädellä elimistön lämpötilaa. (1)

Iho on aistinelin ja tästä syystä sen rakenteeseen kuuluu runsaasti sensorisia sekä sympaattisen hermoston efferentteja hermoja. Hermopunos sijaitsee papillaari- ja retikulaarikerrosten välissä samoin kuin verisuonet. Vapaat hermopäätteet aistivat lämpöä, kipua ja kutinaa, sekä Pacinin ja Meissnerin keräset venytystä. Sympaattisen hermoston efferentit hermot aktivoivat hikirauhasia sekä ihon karvatupen karvankohottajalihasten sileälihassoluja. (2)

Ihon rauhaset sijaitsevat verinahassa ja voivat avautua joko karvatuppeen tai ihon pinnalle. Talirauhaset sijaitsevat verinahassa ja avautuvat usein karvatupen yläosaan. Karvattomilla alueilla, mm. silmäluomilla ja nänneillä, rauhaset avautuvat ihon pinnalle. Talirauhasten tuottama tali ylläpitää sarveiskerroksen ja karvatupen rakennetta, ja sillä on antibakteerisia sekä antimykoottisia ominaisuuksia. (1) Hikirauhaset voidaan jakaa kahteen päätyyppiin: ekkriinisiin sekä apokriinisiin rauhasiin. Ekkriiniset hikirauhaset

huolehtivat lämmönsäätelystä ja avautuvat ihon pinnalle. Apokriiniset hikirauhaset tuottavat proteiinipitoista hikeä ja erittävät sen karvatuppeen kainalon sekä välilihan alueella. (1, 2)

Verinahan alla sijaitseva ihonalaiskerros, subcutis, koostuu rasvakudoksesta ja löyhästä sidekudoksesta ja se sisältää myös suuremmat suonet sekä hermot, joista verinahan punokset ovat peräisin. Ihonalaiskerroksen paksuus vaihtelee henkilöstä riippuen, mm. rasvakudoksen määrän mukaan. (1)

## **2.2 Immunologia**

Immuunijärjestelmä suojaa elimistöä sisäisiltä ja ulkoisilta taudinaiheuttajilta, patogeeneiltä, sekä sen omien solujen virheelliseltä toiminnalta. Immunologinen vaste voidaan jakaa luontaiseen, synnynnäiseen immunitettiin sekä adaptiiviseen, hankittuun immunitettiin. Luonnollinen immunitetti toimii nopeasti, eikä vaste riipu taudinaiheuttajasta vaan se toistuu aina samankaltaisena. Adaptiivinen immunitetti aktivoituu, jos luonnollisen immuunivasteen mekanismit eivät kykene tuhoamaan taudinaiheuttajaa. Vaste on taudinaiheuttajalle spesifinen ja muodostaa muistin tätä vastaan. Luonnollisen immunitetin seurauksena muistia ei synny.

### **2.2.1 Luontainen ja adaptiivinen immunitetti**

Luonnolliseen immuunipuolustukseen kuuluvat elimistön mekaaniset ja kemialliset esteet, kuten iho, värekarvat hengitysteissä, ympäristön happamuus (esimerkiksi ruuansulatusjärjestelmä sekä emätin) sekä erilaiset eritteet (esimerkiksi kyynelneste). Ihon, ruuansulatuskanavan ja genitaalien normaalifloora estää haitallisten mikrobien pääsyä elimistöön sekä rajoittaa niiden kasvua kyseisillä pinnoilla. Elimistön sisällä taudinaiheuttajat pyritään tuhoamaan erilaisilla antimikrobiaalisilla entsyymeillä (bakteerien soluseinää hajottava lysosyymi) ja proteiineilla (mm. keratinosyyttien tuottama  $\beta$ -defensiini ja katelisiidiini). Tärkeisiin välittömiin reaktioihin lukeutuu myös komplementtijärjestelmän aktivoituminen. Komplementtijärjestelmä koostuu noin 30:stä plasman proteiinista, jotka houkuttelevat paikalle fagosytoivia soluja eli indusoivat kemotaksista, päällystävät eli opsonoivat taudinaiheuttajat helpompaa fagosytoosia varten sekä muodostavat taudinaiheuttajien solukalvoa tuhoavan MAC-kompleksin



(engl. membrane-attack complex). Soluvälitteinen immunitetti aktivoituu näiden lisäksi tarvittaessa (7)

Luonnollisen immuunipuolustuksen soluja ovat neutrofiilit, makrofagit, dendriittisolut, syöttösolut, eosinofiilit, basofiilit sekä NK-solut. Neutrofiilit toimivat tulehduksen ensilinjan fagosytoivina soluina. Monosyyteistä erilaistuneet makrofagit fagosytoivat taudinaiheuttajia sekä toimivat antigeeniä esittelevinä soluina (engl. antigen presenting cells, APC-solut). Makrofagit indusoivat interferonivastetta (IFN-vaste) erityisesti virusinfektion seurauksena. Dendriittisolut toimivat antigeeniä esittelevinä soluina, jotka aktivoivat adaptiivista immuunijärjestelmää. Syöttösolut vapauttavat antigeenin kohdatessaan histamiinia, joka laajentaa läheisiä verisuonia. Eosinofiilit sekä basofiilit toimivat parasiitti-infektioissa. Luonnolliset tappajasolut, NK-solut (engl. natural killer cell) tappavat syöpäsoluja ja viruksen infektoimia soluja. (7)

Adaptiiviseen immunitettiin kuuluvia soluja ovat T- ja B-solut. Ne sijaitsevat pääasiassa lymfaattisessa kudoksessa, jonne dendriittisolut vaeltavat esittelemään niille kohtaamansa antigeenit. Tapahtumaa tarvitaan solujen aktivaatioon. T-solut voidaan jakaa auttaja-T-soluihin (CD4+ Th-solu) ja tappaja-T-soluihin (CD8+ T-solu). Auttaja-T-solut jakautuvat edelleen säätelijä-T-soluihin ( $T_{\text{REG}}$ -solut), Th1-, Th2- ja Th17-soluihin. T-solut tunnistavat antigeenejä, joita esitellään MHC-molekyyleihin liitettynä. Auttaja-T-solut aktivoituvat, kun dendriittisolut esittelevät kohtaamansa solun ulkopuolisen patogeenin (esimerkiksi bakteeri) antigeenin MHC-II molekyylin välityksellä ja ohjaavat immuunijärjestelmän solujen toimintaa. Tappaja-T-solut aktivoituvat, kun solunsisäisen patogeenin (esimerkiksi virus) antigeeni esitellään MHC-I-molekyyliin liitettynä ja tuhoavat solun.  $T_{\text{REG}}$ -solut jarruttavat puolustusjärjestelmän toimintaa ja ylläpitävät immunologista toleranssia. T-solut tuottavat muistisoluja, joista osa kiertää ympäri koko elimistöä (sentraaliset) ja osa asettuu kudokseen (kudosspesifit). Näiä B-solut erilaistuvat vasta-aineita tuottaviksi plasmak soluiksi sekä muistisoluiksi. Muistisolut mahdollistavat nopeamman vasteen aktivaation, kun spesifi antigeeni tavataan seuraavan kerran. (7)

Immuunijärjestelmään kuuluu myös soluja, joilla on sekä luonnollisen että adaptiivisen puolustuksen solujen ominaisuuksia. Tällaisia soluja ovat esimerkiksi tyypillisestä T-

soluista poikkeavat  $\gamma\delta$ T-solut, jotka kykenevät tunnistamaan monia antigeenityyppejä, mutta tätä mekanismia ei tunneta vielä kunnolla. (7)

### 2.2.2 Tulehdusreaktio

Tulehdusreaktio syntyy vasteena soluvauriolle. Reaktion tarkoitus on poistaa vaurion syy ja lopulta korjata vaurioitunut alue. (8) Tulehduksessa havaittavia muutoksia ovat tyypillisesti punoitus, turvotus, kuumotus, kipu ja toiminnan heikkeneminen. Tulehdus voi olla akuutti tai krooninen ja näiden immunologiset profiilit ovat hyvin erilaisia.

Akuutti tulehdus syntyy nopeasti ja kestää korkeintaan muutamia päiviä. Kudoksen fagosytoivat solut, pääasiassa makrofagit, tunnistavat mikrobeille ominaisia PAMP-rakenteita (engl. pathogen-associated molecular patterns) sekä soluvaurioiden ja -stressin merkkejä välittäviä DAMP-rakenteita (engl. damage-associated molecular patterns) solukalvon PRR-reseptorien avulla (engl. pattern recognition receptors). Rakenteiden tunnistus vapauttaa erilaisia tulehdusta välittäviä proteiineja ja immuunijärjestelmää sääteleviä sytokiineja sekä aktivoi solun sisäisen vaaraa tunnistavan proteiinikompleksin, inflammasomin. Inflammasomi aktivoi tulehdusta ja johtaa kuumeen nousemiseen. (7)

Solujen tuottamat välittäjäaineet sekä komplementti houkuttelevat paikalle tulehdussoluja (kemotaksis), aiheuttavat ympäröivien verisuonien laajenemista eli vasodilataatiota ja lisäävät verisuonten endoteelisolujen adheesiomolekyyliä. Vasodilataation seurauksena verenkierto alueella lisääntyy ja aiheuttaa alueen punoitusta. Adheesiomolekyyliä helpottavat leukosyyttien siirtymistä alueelle verenkierrosta. Myös verisuonten seinämien läpäisevyys lisääntyy, joka helpottaa solujen siirtymistä tulehduspaikalle. Läpäisevyyden lisääntyminen lisää nesteen määrää alueella ja aiheuttaa turvotusta sekä kipua. (7) Ensimmäiset paikalle saapuvat solut ovat neutrofiilejä, jotka aloittavat vaurioalueen puhdistuksen. Neutrofiilit muodostavat suurimman osan akuutin tulehduksen alkuvaiheen soluista, mutta kuolevat nopeasti. (8) Makrofagit siirtyvät alueelle hitaammin ja erittävät tulehdusta aktivoivia sytokiineja. Makrofagit aktivoivat dendriittisoluja, jotka kutsuvat lymfosyyttejä tulehdusalueelle tulehduksen edetessä. (7)

Krooninen tulehdus alkaa hitaasti ja on vasteeltaan heikompi kuin akuutti tulehdus. Kudoksessa havaitaan samanaikaisesti solutuhhoa sekä parantumista ja tulehdus voi kestää

viikkoja tai vuosia. Sen soluprofiili koostuu pitkälti makrofageista ja lymfosyyteistä. Vaurioituneella alueella havaitaan verisuonien muodostumista, angiogeneesiä, sekä usein arpeutumista, eli normaalin kudoksen korvautumista fibroottisella kudoksella, jolloin sen toiminta heikkenee. Krooninen tulehdus liittyy tyypillisesti erilaisiin pitkäaikaisiin infektioihin (esimerkiksi tuberkuloosi), autoimmuunitauteihin, allergiaan sekä pitkäaikaiseen toksiinialtistukseen. Myös akuutti tulehdus voi kroonistua. Kroonisen tulehduksen ajatellaan liittyvän myös muiden sairauksien, kuten diabeteksen sekä Alzheimerin taudin syntyyn. (8)

### **2.2.3 Iho immunologisena elimenä**

Iho toimii tiiviinä mekaanisena esteenä kehon ja ulkomaailman välillä. Mekaanisen esteen lisäksi epiteelin kemialliset esteet sekä symbioottiset mikro-organismit pyrkivät eliminoimaan taudinaiheuttajan. Ihossa havaitaan myös monia puolustusjärjestelmän soluja.

Epidermiksessä voidaan tavata epidermaalisia dendriittisoluja eli Langerhansin soluja, T-muistisoluja (CD8+ T-muistisolut) sekä pieniä määriä  $\gamma\delta$ T-soluja. Langerhansin solut sijaitsevat okasolukerroksessa ja niiden ulokkeet ylettyvät sarveiskerrokseen jyväissolukerroksen liitoksien läpi ja osallistuvat antigeenien esittelyyn. Esittelyn lisäksi ne osallistuvat antigeenien tunnistukseen ja vasteen ohjaamiseen. Langerhansin soluilla on havaittu myös immunitettia vaimentavia (immunosuppressiivisia) ominaisuuksia. (9)

Dermiksessä sijaitsevia immuunijärjestelmän soluja ovat syöttösolut, makrofagit, erilaiset dendriittisolut, luontaiset lymfosyytit (ILC-solut, engl. innate lymphoid cell), CD4+ Th-muistosolut, T<sub>REG</sub>-muistisolut sekä  $\gamma\delta$ T-solut. (9)

## **2.3 Psoriaasi**

Psoriaasi on krooninen, immunologinen tulehdustauti, joka voi esiintyä sekä iholla että nivelissä. (10) Psoriaasia esiintyy noin kahdella prosentilla väestöstä länsimaissa. (11) Suomessa ihopsoriaasia sairastaa noin 100 000 ihmistä. (10) Psoriaasiläiskät ovat keskenään samankaltaisia, selkeärajaisia, kohonneita ja punoittavia, ja niiden pintaa peittää liuskainen hilsekerros. (11, 12)

Psoriaasin diagnoosi tehdään usein kliinisen tutkimuksen pohjalta. Diagnoosin sekä jatkohoidon apuna toimiva PASI-arvo (Psoriasis Area and Severity Index) on luotu kuvaamaan ihopsoriaasin levinneisyyttä sekä läiskien paksuutta, punaisuutta ja hilseilyä. (11) PASI-arvo vaihtelee 0-72 välillä.

Ihopsoriaasi voidaan jakaa viiteen päätyyppiin: läiskäpsoriaasiin (psoriasis vulgaris), pisarapsoriaasiin (psoriasis guttata), taivepsoriaasiin (psoriasis inversa), märkärakkulaiseen psoriaasiin (psoriasis pustulosa) sekä koko ihon psoriaasiin (psoriasis erythrodermia). (11) Läiskäpsoriaasia sairastaa noin 90% kaikista psoriaasia sairastavista potilaista. (11) Läiskäpsoriaasia esiintyy usein päänahan, kyynärpäiden, polvien, pakaroiden, säärien etuosien sekä sukupuolielinten alueella. (13) Pisarapsoriaasissa potilaalla nähdään nimensä mukaisesti pisanmuotoisia läiskiä usein vartalon alueella. (13) Taivepsoriaasissa läiskä muistuttaa hautumaa tai mikrobi-infektiota ja sijaitsee esimerkiksi kainaloissa, rintojen alla, nivusissa, pakaroiden välissä ja navassa. (13) Märkärakkulaisessa psoriaasissa punertavien läiskien pinnalla on pieniä steriilejä pusteleita. (13) Läiskiä esiintyy ympäri kehoa sekä paikallisina muotoina (psoriasis pustulosa palmoplantaris sekä acrodermatitis continua suppurativa). (11) Läiskien puhkeamiseen liittyy interleukiini (IL) 36RN mutaatioita sekä CARD14-geeniä aktivoivia gain-of-function mutaatioita. (11) Koko ihon psoriaasi voi muodostua mistä tahansa psoriaasin muodosta. (11) Koko ihon psoriaasissa läiskät peittävät yli 75% ihosta. (13)

Psoriaasin puhkeaminen on todennäköisempää, jos henkilön lähisuvussa esiintyy tautia. (11) Kromosomeista on löydetty psoriaasiin liittyen yhdeksän aluetta, eli lokusta, joissa sijaitsevilla geeneillä on tilastollista merkitystä psoriaasin syntyyn (PSORS1-9). (12) 6p kromosomissa sijaitseva PSORS1 sisältää muiden geenien lisäksi psoriaasin esiintyvyyteen liitetyn HLA-C geenin, jonka alleelia (HLA-Cw6) pidetään tärkeänä psoriaasille altistavana tekijänä. PSORS1 selittää 35-50% psoriaasin perinnöllisyydestä, mutta yhteyttä ei kuitenkaan olla osoitettu vanhemmalla iällä puhkeavan taudin kohdalla. (12) Psoriaasiin on liitetty myös mm. T-solujen erilaistumiseen liittyvien geenien, IL23R ja IL12B, sekä iholla runsaasti ilmentyvän ubikitinylaatioon osallistuvan ZNF313 geenin eri muodot. (12)

Psoriaasi on monitekijäinen tauti, jonka puhkeamiseen vaikuttaa perimän lisäksi myös ympäristö, joiden yhteisvaikutuksesta immuunipuolustuksen solujen välinen signalointi voi häiriintyä ja johtaa psoriaasille tyypilliseen immunologiseen profiiliin sekä ihomuutoksiin. Tarkkoja taudille altistavia ympäristötekijöitä ei olla pystytty vielä osoittamaan. Eräillä lääkkeillä on huomattu olevan yhteyttä psoriaasin syntyyn. (14) Infektiot voivat liittyä psoriaasin puhkeamiseen, esimerkiksi *Streptococcus pyogenes* -bakteerin aiheuttaman ylähengitysteiden tulehduksen on osoitettu edeltävän pisaaripsoriaasin syntyä. (15) Muita laukaisevia tekijöitä voivat olla mm. ihon vauriot, stressi sekä tupakointi. (14) Samat tekijät voivat pahentaa myös jo puhjenneen taudin oireita.

Edellä mainittujen perimän ja ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksen seurauksena alkaa tapahtumasarja, jossa keratinosyytit, dendriittisolut sekä T-solut (erityisesti Th1 ja Th17) tuottavat välittäjäaineita, jotka johtavat leukosyyttien siirtymiseen alueelle. (11, 12, 14) Samalla keratinosyyttien proliferaatio tehostuu ja niiden erilaistumisaika lyhenee. Erilaistumisajan supistuessa solujen kypsyminen jää epätäydelliseksi, jolloin sarveiskerroksen korneosyyttien tumat säilyvät eli havaitaan parakeratoosia ja jyväissolukerros häviää. (14)

Psoriaasiäiskien alueella okasolukerros on tyypillisesti paksuuntunut sekä papillaarikerroksen papillat pidentyneet, eli havaitaan papilloomatoosia. Papilloomatoosin seurauksena verisuonet sijaitsevat lähellä pintaa, joka aiheuttaa läiskässä pistemäistä verenvuotoa. Leukosyyttien määrä kasvaa alueella pysyvästi. Epidermiksessä havaitaan erityisesti tappaja-T-soluja (CD8+) ja neutrofiilikertymiä (Munron mikroabsessit). Dermiksessä havaitaan lisääntynyt määrä T-soluja sekä dendriittisoluja. (14)

Psoriaasia sairastavilla potilailla on huomattu esiintyvän useita liitännäissairauksia. Näitä sairauksia ovat mm. diabetes (erityisesti II tyypin diabetes), Crohnin tauti, metabolinen oireyhtymä, erilaiset syövät sekä masennus (16). Liikalihavuutta, kohonnutta verenpainetta sekä hyperlipidemiaa esiintyy myös usein (17). Sydän- ja verisuonisairauksien riski on myös suurempi psoriaasia sairastavilla potilailla. Veren kohonneet tulehdusarvot sekä psoriaasiin yhdistettyjen sytokiinien ja auttaja-T-solujen

määrän kasvu viittaavat laajempaan systeemiseen tulehdustilaan (18-20). Systeeminen tulehdus voi altistaa edellä mainituille liitännäissairauksille.

Koska psoriaasille ei olla löydetty parantavaa hoitoa, hoidon tavoitteena on potilaan elämänlaadun parantaminen ja oireiden hallinta. Lievää psoriaasia hoidetaan pääasiallisesti paikallishoidolla: perusvoiteilla, salisyylihapolla, kortikosteroidivoiteilla, D-vitamiinijohdoksilla (kalsipotrioli ja kalsitrioli) sekä ditranolilla eli antraliinilla. Paikallishoidoilla tehostetaan myös vaikeampien psoriaasimuotojen hoitoa. UV-valohoitoa käytetään, jos paikallishoito ei tehoa ja sitä voidaan yhdistää myös muiden hoitomuotojen kanssa. Kapeakaista-UVB on ensisijaisesti käytetty UV-valohoidon muoto. (21)

Keskivaikean tai vaikean psoriaasin hoitoon käytetään myös sisäistä lääkitystä. Tavanomaisia lääkkeitä ovat asitretiini, metotreksaatti sekä siklosporiini. (21) Asitretiini normalisoi orvaskeden solujen proliferaatiota ja erilaistumista, metotreksaatti toimii solunsalpaajana ja siklosporiini vähentää tulehdusta ja indusoi remissiota. (22, 23) Apremilastia, kinaasin estäjä, voidaan käyttää, jos tavanomainen lääkitys ei sovi. Vaihtoehtoisena, suhteellisen uutena lääkeryhmänä ovat biologiset lääkkeet, jotka voidaan jakaa tuumorinekroositekijä alfan estäjiin, IL-12:n ja -23:n estäjiin sekä IL-17 estäjiin. (21) Ensimmäiset biologiset lääkkeet tulivat markkinoille noin 10 vuotta sitten ja uusia lääkkeitä kehitetään jatkuvasti.

## **2.4 Ihotautilien tutkiminen transkriptomiikalla**

Geenien tuotteenä syntyy erilaisia RNA-molekyylejä, joita voidaan eristää solusta ja analysoida erilaisin menetelmin. Geenien ilmentyminen, ekspressio, määritetään sen perusteella, kuinka paljon kyseistä RNA-molekyyliä tuotetaan. Määrää voidaan verrata standardoituun kontrolliryhmään, jolloin voidaan päätellä, ilmentyykö geeni enemmän vai vähemmän verrattuna kontrolleihin. Aiemmin käytettiin reaaliaikaisia lähetti-RNA:n monistamiseen perustuvia menetelmiä yksittäisten geenien tutkimiseksi, mutta nykyään on siirrytty genominlaajuisiin analyysiin.

RNA-molekyylien tunnistusta tehdään pääosin kahdella tavalla. Eristetty RNA voidaan sitouttaa sirulle, joka sisältää tietyn määrän geenien tuotteita vastaavien RNA-

molekyylien emäsjärjestykselle komplementaarisia koettimia, joihin molekyylit tarttuvat. RNA-molekyylit leimataan fluoresoivilla väriaineilla, joiden fluoresenssin perusteella voidaan määrittää molekyylien määrä eli geenin ilmentyminen näytteessä. Värjäyksessä käytetään usein kahta väriainetta, mutta esimerkiksi Affymetrix-sirussa käytetään vain yhtä. (24) Koska koetin tulee valmistaa vastaamaan tiettyä RNA-sekvenssiä, menetelmällä saadaan tietoa vain tunnettujen geenien ilmentymisestä. (25)

RNA-sekvensointi (RNA-seq) mahdollistaa koko RNA-profiilin tarkastelun ja näin tarkemman ilmentymisanalyysin. Menetelmällä voidaan tutkia myös sellaisten geenien tai sen niiden varianttien ilmentymistä, joita ei olla aikaisemmin liitetty tutkittavaan sairauteen tai ilmiöön. Sekvensointi tuottaa kuitenkin suuren määrän dataa, jonka käsittely vaatii kehittyneitä menetelmiä ja suurta laskentatehoa, jotta analyysijä pystytään suorittamaan tehokkaasti.

Geenit voidaan yhdistää erilaisiin biologisiin reitteihin ja prosesseihin, jolloin voidaan tarkastella ilmentymisprofiilin yhteyttä näihin mekanismeihin. Analyysissä voidaan määritellä, onko näytteessä jokin biologinen reitti yli- tai ali-ilmentynyt, joka mahdollisesti selventää oireiden syntyä ja prosessien etenemistä kyseisessä tilanteessa.

### 3 Tutkimuksen tavoitteet

Psoriaasin diagnoosi sekä hoitomuodon valinta tehdään lähinnä sairauden kliiniseen kuvan perusteella. Hoidot eivät kykene parantamaan sairautta ja läiskät palaavat usein uudestaan. Tässä tutkimuksessa analysoitiin 303 kappaletta näytteitä, joiden perusteella pyrittiin selvittämään mekanismeja, jotka mahdollistaisivat jatkossa psoriaasin aikaisemman diagnoosin sekä uusien hoitomuotojen tehokkaamman kehityksen.

Tutkimuksen ensimmäisenä tavoitteena oli selvittää, eroaako psoriaatikon läiskäisen (lesionaalisen) ja läiskättömän (non-lesionaalisen) ihon geenien ilmentyminen toisistaan ja jos eroaa, niin miten. Vertailu suoritettiin analysoimalla ihonäytteiden transkriptomia erilaisin menetelmin.

Toisena tavoitteena oli selvittää, miten psoriaatikon läiskättömän ihon geenien ilmentyminen eroaa kontrolli-ihosta.

### 4 Aineisto

Ihobiopsiat kerättiin psoriaasia sairastavilta potilailta läiskäiseltä sekä läiskättömältä iholta takareiden ja pakaran alueelta. Terveiltä kontrollihenkilöiltä otettiin koepalat samoilta alueilta. Näytteitä kerättiin 96 Helsingin yliopistosta (UH, Suomi), 113 Kings College Londonista (KINGS, Iso-Britania) sekä 94 Heinrich-Heine-Universitaet Düsseldorfista (HHU, Saksa). Psoriaasiläiskän alueelta kerättiin 108 näytettä, läiskättömältä alueelta 97 ja terveiltä kontrolleilta 98. Yhteensä näytteitä kerättiin 303 kappaletta. Näytteenoton yhteydessä potilaille määriteltiin PASI ja tämä sekä muut kerätyt potilastiedot taulukointiin fenotyypitaulukoksi (engl. phenodata) (Kuva 2a ja b).

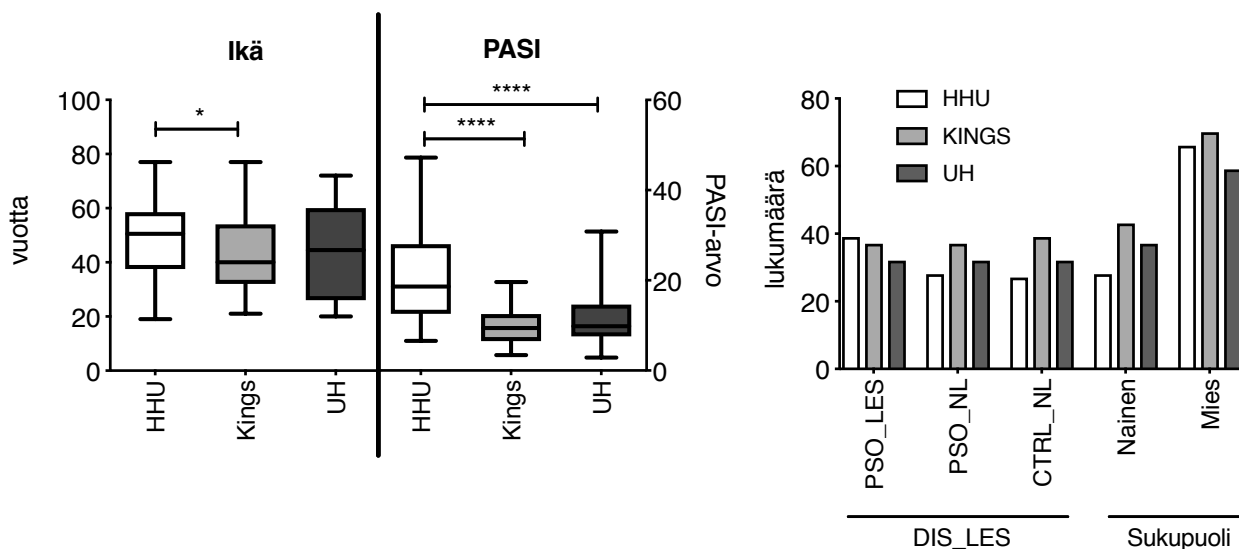
Koepalojen tyyppi määriteltiin sen mukaan, sairastiko henkilö psoriaasia ja otettiinko koepala läiskän alueelta vai terveeltä iholta. PSO\_LES ryhmä kuvaa koepalaa, joka on otettu psoriaasia sairastavan henkilön läiskän alueelta, PSO\_NL kuvaa psoriaasia



sairastavan henkilön terveeltä iholta otettua koepalaa ja CTRL\_NL kuvaa kontrollihenkilön terveeltä iholta otettua koepalaa.

Koepaloista eristetyistä totaali RNA:sta määritettiin geenien ilmentymistä Affymetrix Gene ST 2.1 96 -sirua käyttäen. RNA: eristettiin Karoliinisessa Instituutissa (Ruotsi) Juha Keren ryhmässä ja sirut valmistettiin Vassili Soumelisin ryhmässä Institut Curie:ssä (Ranska). Fluoresoivalla aineella värjättyt cRNA:t sitoutuvat koettiin ja havaitun intensiteetin perusteella voidaan määrittää kuinka paljon kyseisen geenin tuotteita solu ilmentää. Intensiteettien lukuarvoista muodostettiin tulostiedosto jokaiselle näytteelle.

Geenien ilmentymisen analyysissä käytettiin fenotyyppidataa sekä sirun perusteella saatua intensiteettiarvoa. Analyysillä määriteltiin eri tavalla ilmentyneet geenit sekä niihin liittyvät biologiset reitit.



**Kuva 2a. Iän sekä PASI:n vaihtelu eri näytteenottoaikoissa.**

Potilaiden ja kontrollihenkilöiden ikä vaihteli 19 ja 77 välillä. PASI jakautui psoriaasia sairastavilla potilailla 2,09 ja 47,02 välille

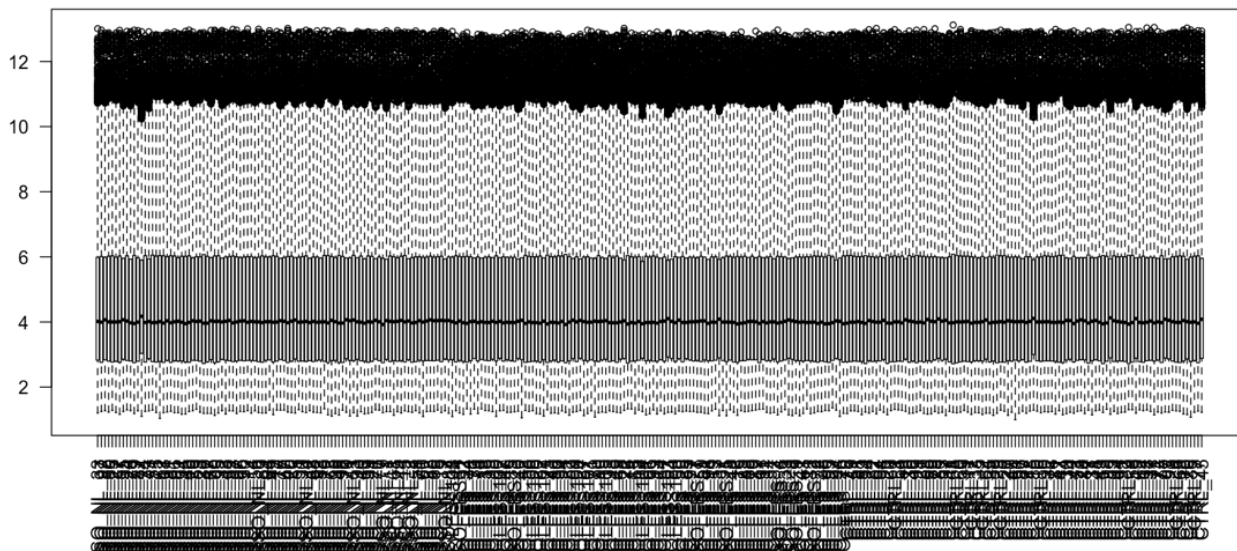
**Kuva 2b. Koepalojen tyypit (DIS\_LES) ja potilastiedot sukupuolen mukaan.**

## 5 Menetelmät

### 5.1 eUTOPIA

R-ohjelmointikieleen perustuva eUTOPIA mahdollistaa datan esikäsittelyn ilman koodaamista graafisen käyttöliittymän avulla. (26) Ohjelma käyttää R-ohjelmiston ja avaa käyttöliittymän nettiselaimen, johon syötetään analyysia varten tarvittavat tiedostot.

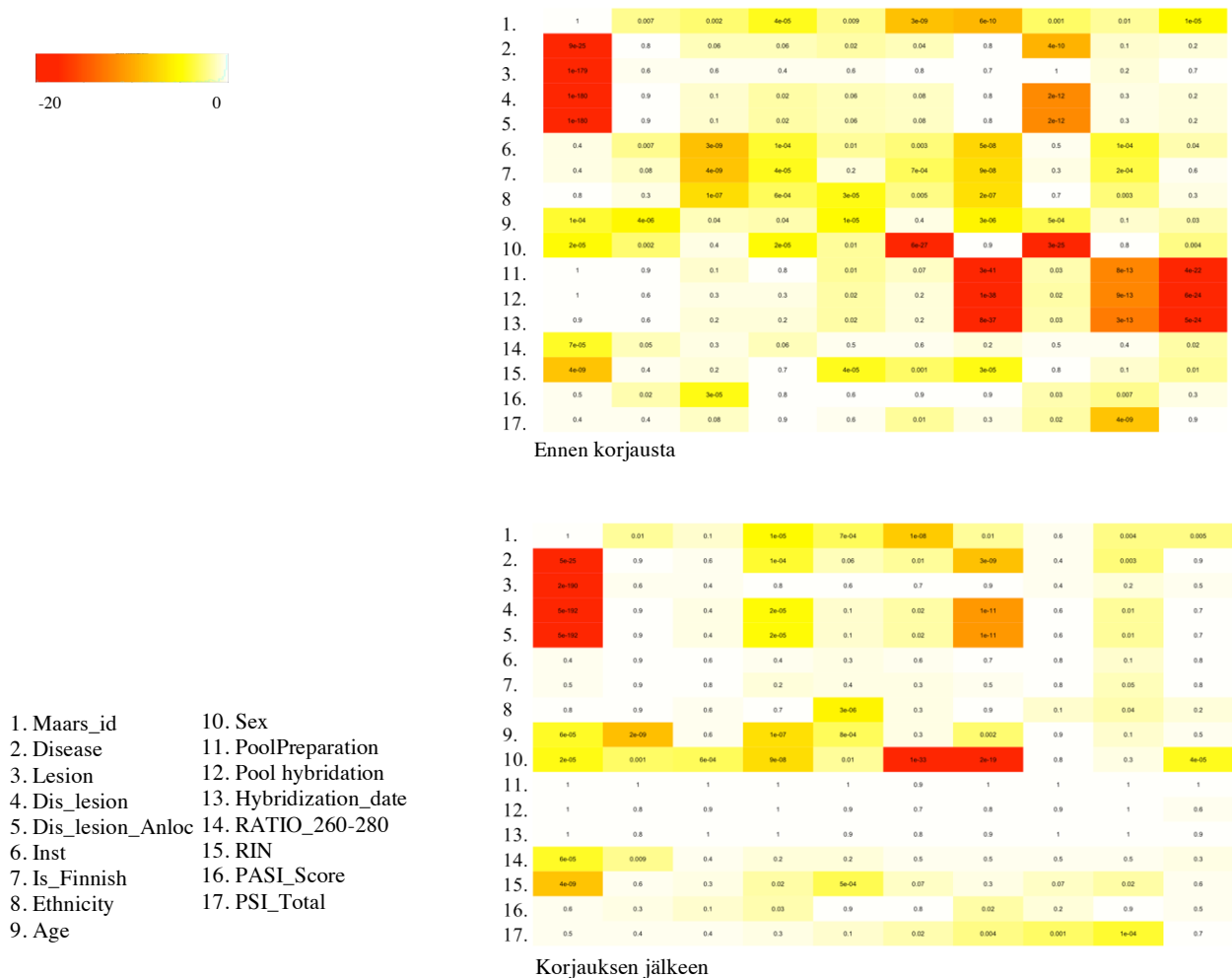
Siruilta saatava tieto esikäsiteltiin ohjatusti eUTOPIA:n graafisen käyttöliittymän avulla etenemällä suositellussa järjestyksessä: normalisaatio (Kuva 3), suodatus, eri työvaiheisiin ja eriin liittyvien virheiden korjaus sekä lineaarinen mallinnus (limma). Ohjelmaan ladattiin fenotyypidata tabulaattorin rajoittamassa tekstimuodossa (engl. tab-delim), sirujen tuottama ilmentymisdata jokaisesta näytteestä CEL-muodossa sekä annotaatioita varten sirun koettimia vastaavien ihmisen geenien tunnukset CDF (engl. chip description file) muodossa. Affymetrix tuottaa valmiiksi normalisoitua ja aggregoitua dataa, joten näitä vaiheita ei tarvitse erikseen suorittaa eUTOPIA:lla.



Kuva 3. eUTOPIA:n tuottama kuva normalisoidusta datasta.

Ohjelmalla ei suoritettu laaduntarkastusta, koska datan lähde tunnettiin ja se oli todettu luotettavaksi ajon jälkeen tehdyssä laatuanalyysissä. Näytteiden käsittelyyn liittyvät mahdolliset virheelliset korrelaatiot korjattiin Combat mallin avulla ottaen huomioon näytteenottoaika (Inst) sekä ryhmä, jossa näytteet valmisteltiin (PoolPreparation).

Kovariantteina käytettiin näytteiden antaneiden henkilöiden ikää sekä sukupuolta (Kuva 4).



**Kuva 4. ”Prince Plot”, (fenotyypin) muuttujien assosioituminen eri pääkomponenttien välillä ennen ”Batch”-korjausta ja sen jälkeen.**

Differentiaalianalyysi suoritettiin Bioconductorin Limma-paketilla. Vertailuun käytettiin psoriaasia sairastavien henkilöiden läiskäisen ihon (PSO\_LES), psoriaasia sairastavien läiskättömän ihon (PSO\_NL) sekä kontrollihenkilöiden ihon (CTRL\_NL) transkriptomia. Vertailut tehtiin PSO\_LES ja CTRL\_NL, PSO\_LES ja PSO\_NL sekä PSO\_NL ja CTRL\_NL välillä. P-arvon raja-arvona käytettiin  $<0.01$  ja geenien ilmentymisen voimakkuuden (FC - engl. fold change) raja-arvona oli 0.58, joka tarkoittaa, että geenien ilmentyminen oli noussut tai vähentynyt vähintään 1,5 kertaisesti.

## 5.2 Perseus

Perseus-analyysissä (27) käytettiin eUTOPIAn korrelaatioiden korjauksen jälkeen saatua intensiteettimatriisia. Geenit on nimetty taulukossa symbolein. Ohjelman avulla suoritettiin monimuuttujatesti ANOVAa sekä FDR (engl. false discovery rate) Benjamini-Hochbergia korjausta käyttäen. Z-score (ilmentyminen +/- kaikkien näytteiden keskiarvoon verrattuna) määritettiin käyttäen annettuja oletusasetuksia. Saadun ANOVA q-arvon perusteella muodostettiin kolmiulotteinen lämpökartta (engl. heatmap) 50 merkittävimmästä geenistä. Lämpökartta muodostettiin käyttäen oletusasetuksia: euclidinen välimatka (engl. euclidean distance), keskiarvoinen kytkentä (engl. average linkage), ryhmittymiä (engl. cluster) muodostettiin 300, maksimaalinen iteraatioiden määrä oli 10 ja uudelleenkäynnistysten määrä oli 1.

## 5.3 IPA, Panther ja Enrich R

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) -ohjelmaa (QIAGEN Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>) käytettiin analyysissä eUTOPIA:n geenilistojen ensemble tunnusten muokkaamiseen geenisymboleiksi. Listat ladattiin ohjelmaan, joka tuotti automaattisesti ensemble-tunnusten vierelle niitä vastaavat geenisymbolit. Jatkossa käytetyt ohjelmat tunnistavat geenit symbolein, joten vaihto suoritettiin analyysin helpottamiseksi.

IPA:n kanonisten reittien (engl. canonical pathways) rikastumisanalyysiä käytettiin eri vertailujen eri tavalla ilmentyvien geenien (differentiaaliekspressoituvat geenit, DEG) funktioiden selvittämiseksi.

Panther (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, <http://geneontology.org>) luokittelee proteiinit ja niitä vastaavat geenit perheen, perheiden alaryhmien, molekylaarisen funktion, biologisen prosessin sekä reittien mukaan. Rikastumisanalyysillä haluttiin selvittää geeneihin liittyvät biologiset prosessit. Ohjelma avautuu nettiselaimen ja geenit syötetään siihen listana entrez gene symboleina. Biologisten reittien listat voidaan ladata sivulta analyysin jälkeen.

Enrich R (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) toimii selaimen kautta samoin kuin Panther ja käyttää ladatun geenilistan analysoimiseen useita eri järjestelmiä (mm. GO-biological processes). Analyysi tuottaa biologisten reittien listan, joka voidaan ladata txt-muodossa.

## 5.4 Venny

Vertailujen eri tavalla ilmentyvien geenien listat ladattiin symbolimuodossa Vennyyn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), jonka avulla muodostettiin venn-diagrammit, joissa näkyvät eri vertailuille spesifisten ja yhteisten geenien lukumäärät. Diagrammien eri ryhmiin eriteltyt geenit listattiin omaksi excel-tiedostokseen jatkoanalyysia varten.

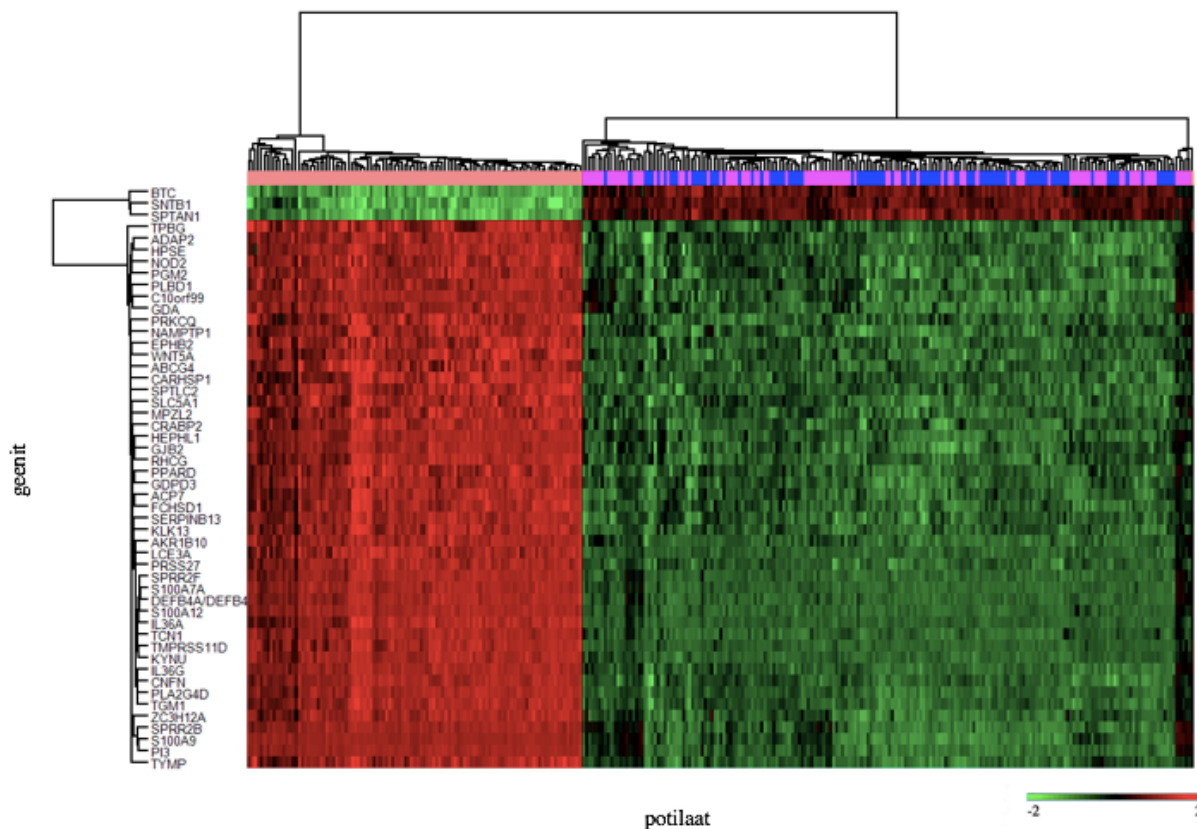
## 5.5 INFORM

Ohjelmaa (28) käytettiin eri tavalla ilmentyvien geenien muodostamien geeniverkostojen (moduulien) analysoimiseen ja moduuleihin liittyvien biologisten funktioiden määrittämiseen. Aineistona analyysiin toimi eUTOPIA:n DEG-lista, joiden geneistä valikoitiin otos rajaamalla kaksikantainen logaritminen FC arvoon 1.

## 6 Tulokset

### 6.1 Eri tavalla ilmentyvät geenit

Ryhmien mahdollisten erojen tarkastelemiseksi eUTOPIAn muodostama DEG:ien intensiteettimatriisi syötettiin Perseukseen, jolla laskettiin tilastollisesti (ANOVA) 50 kaikille ryhmille merkittävintä geeniä. Geenien ilmentyminen visualisoitiin lämpökartassa (Kuva 5) intensiteettiarvoina. Mitä enemmän näytteessä on kyseistä geeniä, sitä enemmän sitä sitoutuu koettimelle ja sitä suurempi intensiteetti saadaan. Intensiteettiin liittyvä väri osoittaa geenien ilmentymisen voimakkuuden kussakin näytteessä.



**Kuva 5. Lämpökartta ja potilaiden ryhmittely tilastollisesti 50 merkittävimmän geenin osalta.**

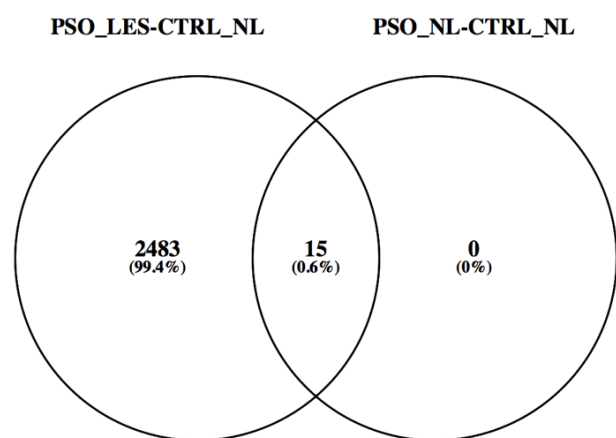
Y-akselilla ovat geenit symboleina esitettynä ja x-akselilla sininen kuvaa tervettä kontrolli-ihoa (CTRL\_NL), pinkki psoriaatikkojen läiskätöntä ihoa (PSO\_NL) ja vaalean punertava klusteri psoriaatikkojen läiskäistä ihoa (PSO\_LES). Punainen kuvaa yli-ilmentyneitä geenejä ja vihreä ali-ilmentyneitä geenejä.

Perseus muodosti näytteistä kaksi erillistä ylärhymää, jotka jakautuivat keskenään pienempiin alaryhmiin. PSO\_LES nähdään erillisenä, vaalean punertavana ryhmittymänä lämpökartan yläosassa. Pinkillä värjätty PSO\_NL sekä sininen CTRL\_NL muodostavat toisen erotettavan ylärhymän ja ovat sekoittuneet keskenään alaryhmiin tasaisesti. Kaksi

yläryhmää ilmentyvät toisilleen täysin vastakkaisella tavalla, mutta PSO\_NL ja CTRL\_NL ryhmien ilmentymisessä ei havaita eroja. Geenien intensiteetti on korkeampi PSO\_LES ryhmässä kolmea geeniä lukuun ottamatta. BTC, SNTB1 ja SPTAN1 muodostavat oman klusterinsa, jonka intensiteetti on huomattavasti korkeampi PSO\_NL sekä CTRL\_NL ryhmässä.

Ryhmiä välillä suoritettiin vertailut seuraavasti: PSO\_LES-CTRL\_NL, PSO\_LES-PSO\_NL ja PSO\_NL-CTRL\_NL. Vertailulle määriteltiin eUTOPIAn avulla näiden DEG:t.

PSO\_LES-CTRL\_NL vertailussa DEG:jä löydettiin 2504 kappaletta (Liite 1), joista 1293 oli yli-ilmentyneitä ja 1211 ali-ilmentyneitä. PSO\_LES-PSO\_NL vertailussa löydettiin 2235 kappaletta DEG:ä (Liite 2), joista 1181 oli yli-ilmentyneitä ja 1054 ali-ilmentyneitä. Näistä 2124 DEG:ä oli samoja PSO\_LES-CTRL\_NL vertailun kanssa. PSO\_NL-CTRL\_NL vertailussa DEG:jä löytyi 15 (Liite 3), joista 13 oli yli-ilmentyneitä ja 2 ali-ilmentyneitä.



**Kuva 6.** Vennillä muodostettu VENN-diagrammi PSO\_LES-CTRL\_NL ja PSO\_NL-CTRL\_NL vertailuille yhteisistä ja erillisistä DEG:stä.

Venn-diagrammista (Kuva 6) nähdään, että kaikki 15 PSO\_NL-CTRL\_NL ryhmässä esiintynyttä DEG:ä esiintyvät myös PSO\_LES-CTRL\_NL ryhmässä. PSO\_LES-CTRL\_NL vertailulle spesifejä geenejä oli 2483 eikä PSO\_NL-CTRL\_NL vertailulle spesifejä geenejä löytynyt.

## 6.2 Biologiset reitit

Geenien funktion selvittämiseksi kunkin vertailun DEG:t analysoitiin kolmea eri menetelmää käyttäen: IPA, Panther ja Enrich R. IPA:n avulla määriteltiin biologiset reitit, canonical pathways, joihin ne osallistuvat. Tässä käytettiin kunkin vertailun koko DEG-listaa. DEG-listat järjestettiin p-arvon mukaan ja valikoitiin 150 merkittävintä geeniä jatkoanalyysia varten. Pantherilla ja Enrich R:llä määritettiin, mihin GO (engl. gene ontology) ”biologisiin prosesseihin” DEG:t rikastuvat. Kunkin vertailun reitit järjestettiin taulukkoon laskevaan järjestykseen merkittävyyden mukaan ja näistä valittiin 20 tilastollisesti merkitsevintä. Merkittävimmät reitit valikoitiin IPA:ssa p-arvon logaritmin vastaluvulla ( $-\log(p\text{-value})$ ), Pantherissa FDR:n logaritmin vastaluvulla ( $-\log(FDR)$ ) ja Enrich R:ssä säädetyn p-arvon logaritmin vastaluvulla ( $-\log(\text{adj. } p\text{-value})$ ). Perseuksella muodostettiin listoista lämpökartat oletusasetuksin.

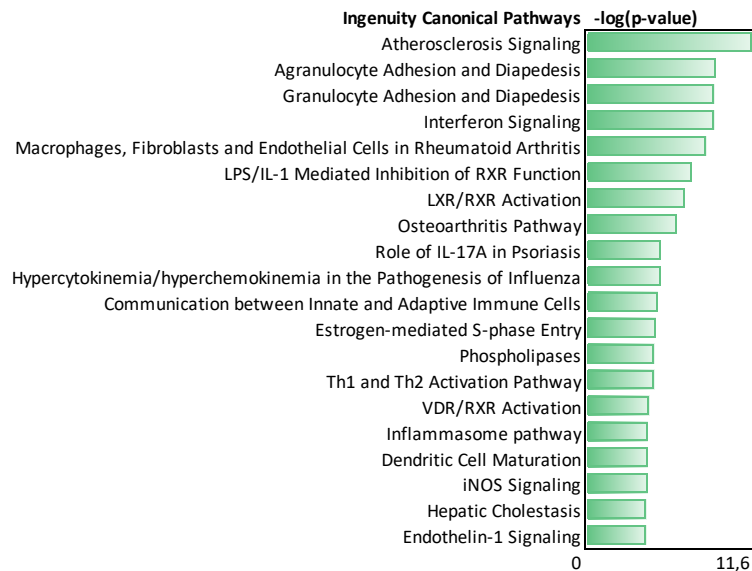
### PSO\_LES-CTRL\_NL

Vertaamalla läiskäisen ihon geenien ilmentymistä terveeseen kontrolli-ihoon, saadaan lisää tietoa psoriaasin vaikutuksesta eri geeneihin ja geenireitteihin. Reittien avulla saadaan kokonaisvaltaisempi kuva psoriaasin vaikutuksesta elimistöön.

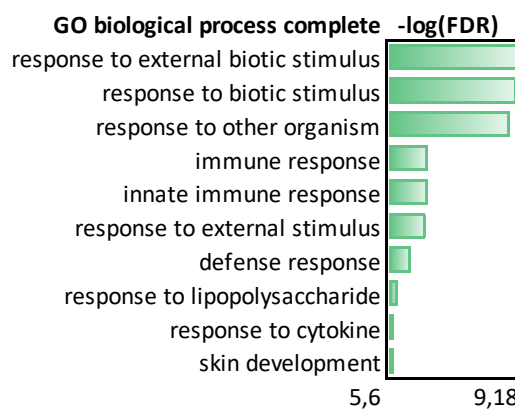
Merkittävimpänä reittinä IPA:n vertailussa esiintyi ateroskleroottinen signalointi, seuraavina granulosityttien sekä agranulosityttien adheesio ja diapedeesi ja interferoni signalointi (Kuva 7).

Pantherin analyysissa merkittävimmät reitit olivat vaste ulkoiseen bioottiseen stimulukseen, vaste bioottiseen stimulukseen, vaste toiseen organismiin, immuunivaste sekä luonnollinen immuunivaste (Kuva 8). Merkittävät reitit liittyivät lähinnä immuunijärjestelmän eri komponentteihin sekä ihon solujen toimintaan.



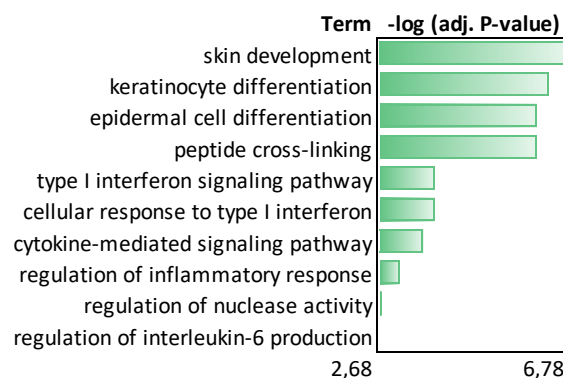


**Kuva 7. IPA-analyysin 20 merkittävintä reittiä PSO\_LES-CTRL\_NL vertailussa.**



**Kuva 8. Panther-analyysin 10 merkittävintä biologista prosessia PSO\_LES-CTRL\_NL vertailussa.**

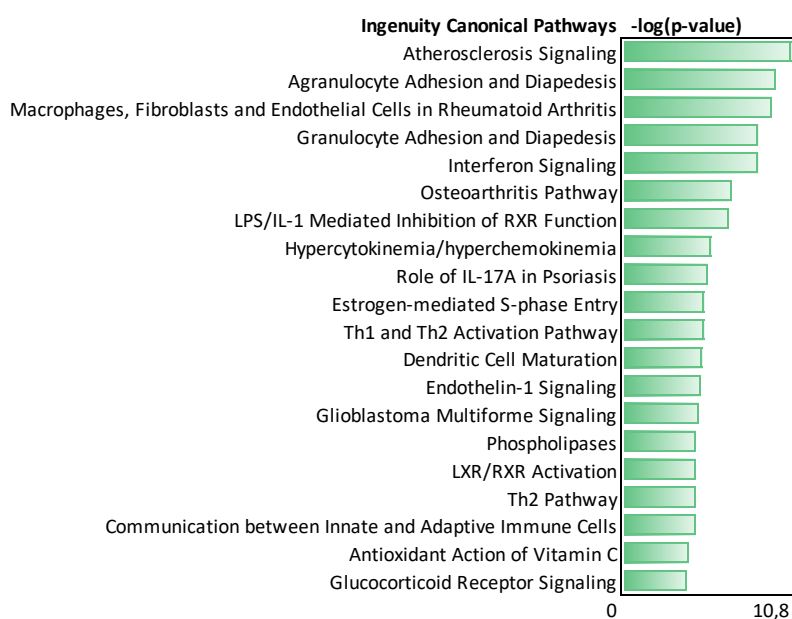
Merkittävimmät reitit Enrich R analyysissä olivat ihon kehittyminen, keratinosyyttien erilaistuminen, epidermaalisten solujen erilaistuminen, peptidien ristisidokset sekä tyypin I interferonin signalointireitti (Kuva 9).



**Kuva 9. Enrich R-analyysin 10 merkittävintä reittiä PSO\_LES-CTRL\_NL vertailussa.**

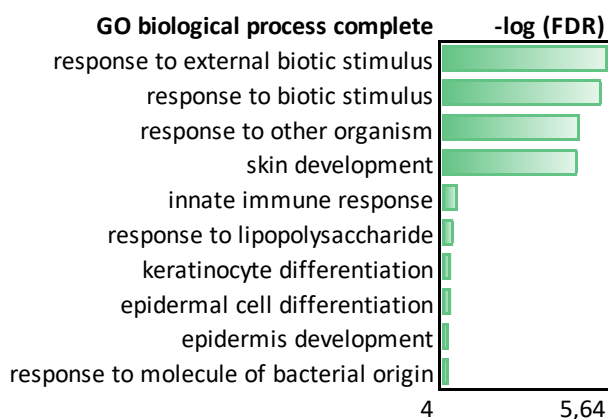
## PSO\_LES-PSO\_NL

Vertaamalla läiskäistä ihoa läiskättömään, voidaan selvittää millä tavalla läiskä vaikuttaa psoriaasia sairastavan henkilön geenien ilmentymiseen ulkoisesti terveillä ihoalueilla. IPA:lla tehdyssä analyysissä merkittävimmät reitit olivat ateroskleroosisignaalointi, agranulosyyttien adheesio ja diapedeesi, makrofagien, fibroblastien ja endoteelisolujen rooli nivelreumassa, granulosyyttien adheesio ja diapedeesi sekä interferonisignaalointi (Kuva 10).



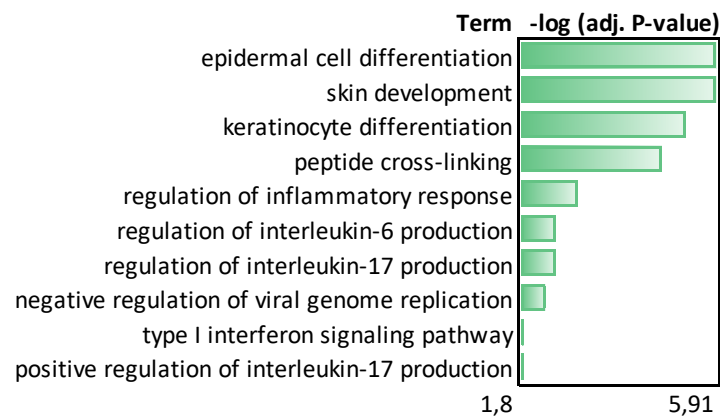
**Kuva 10. IPA-analyysin 20 merkittävintä reittiä PSO\_LES-PSO\_NL vertailusta.**

Pantherin analyysissä merkittävimpiä reittejä olivat vaste ulkoiseen bioottiseen stimulukseen, vaste bioottiseen stimulukseen, vaste toiseen organismiin, ihon kehitys sekä luonnollinen immuunivaste (Kuva 11).



**Kuva 11. Panther-analyysin 10 merkittävintä biologista prosessia PSO\_LES-PSO\_NL vertailussa.**

Enrich R:n vertailussa merkittävimpinä reitteinä esiintyivät epidermaalisolujen erilaistuminen, ihon kehitys, keratinosyyttien erilaistuminen, peptidien ristisidokset sekä tulehdusvasteen säätely (Kuva 12).

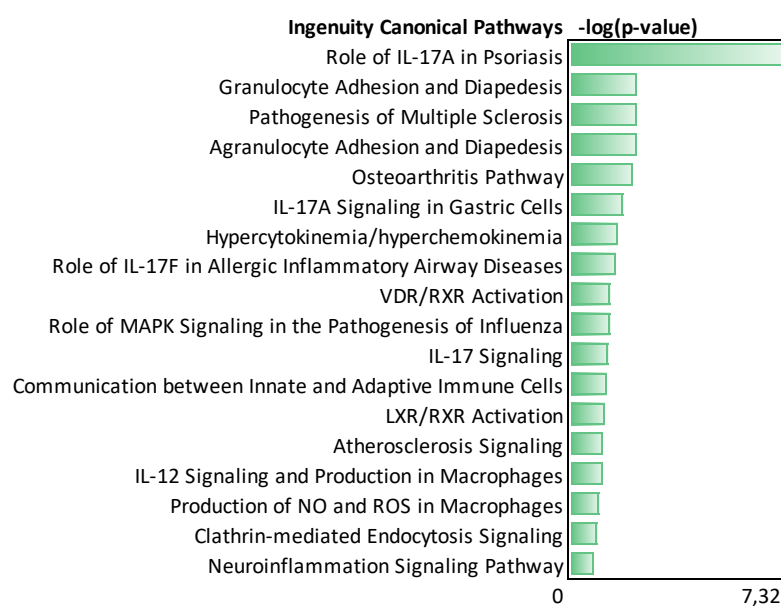


**Kuva 12. Enrich R-analyysin 10 merkittävintä reittiä PSO\_LES-PSO\_NL vertailussa.**

### PSO\_NL-CTRL\_NL

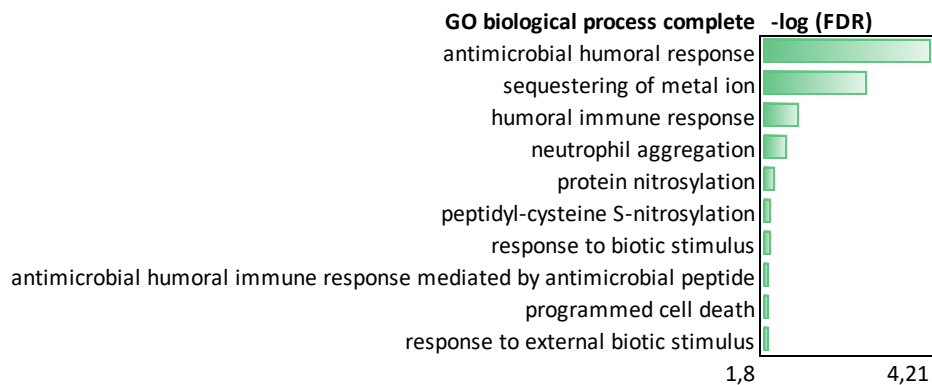
Vertailulla selvitetään, käyttäytyykö psoriaatikon läiskätön iho samalla tavalla kuin terve kontrolli-iho vai muuttaako psoriaasi geenien ilmentymistä myös ulkoisesti terveillä alueilla.

IL-17A:n rooli psoriaasissa esiintyy IPA:n vertailussa merkittävimpana (Kuva 13). IL-17 signaalointi esiintyy vertailussa myös sellaisenaan. Myös suurin osa muista tälle vertailulle merkittävistä reiteistä liittyy immunologiseen aktiivisuuteen.



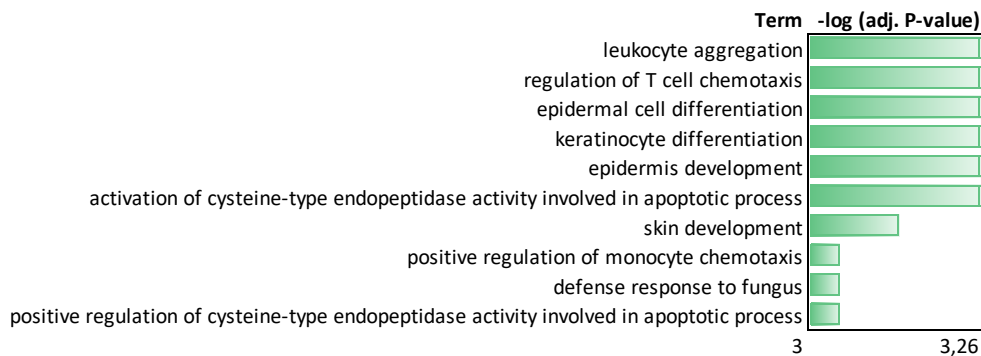
**Kuva 13. IPA-analyysin 20 merkittävintä reittiä PSO\_NL-CTRL\_NL vertailussa.**

Pantherilla tehdyssä analyysissä (kuva 14) tärkeimmäksi osoittautui antimikrobiaalinen humoraalinen vaste. Tätä seurasivat metalli-ioneihin liittyvät reitit, humoraalinen immuunivaste, neutrofiilien aggregaatio sekä proteiinin nitrosylaatio.



**Kuva 14. Panther-analyysin 10 merkittävintä biologista prosessia PSO\_NL-CTRL\_NL vertailussa.**

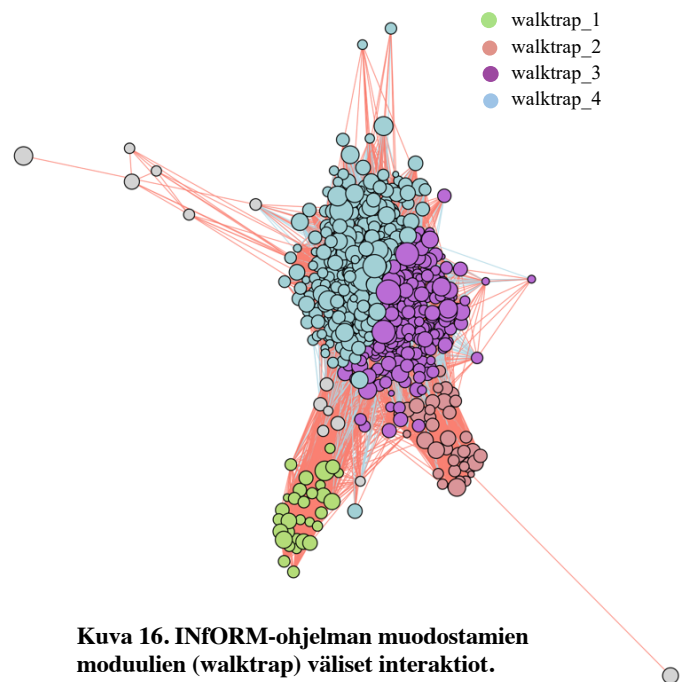
Tärkeimmiksi reiteiksi Enrich R:n analyysissä (kuva 15) osoittautuivat leukosyyttien aggregaatio, T-solujen kemotaksiksen regulaatio, epidermaalisten solujen erilaistuminen, keratinosyyttien erilaistuminen sekä epidermiksen kehittyminen.



**Kuva 15. Enrich R-analyysin 10 merkittävintä reittiä PSO\_NL-CTRL\_NL vertailussa.**

### 6.3 Geenien interaktioverkostot

PSO\_LES-CTRL\_NL vertailun DEG:ien yhteyttä toisiinsa haluttiin tarkastella paremmin, joten geenilista analysoitiin käyttäen INfORM-ohjelmaa. Muodostui neljä moduulia (walktraps). Moduulit sisältävät geenejä, jotka interaktoivat toistensa kanssa ja toimivat osana samaa biologista prosessia (Kuva 16). Moduuli 1 sisältää 32 geeniä, moduuli 2 37, moduuli 3 287 ja moduuli 4 429. Moduuleihin kuulumattomia geenejä löytyi 13 kappaletta.



**Kuva 16. INfORM-ohjelman muodostamien moduulien (walktrap) väliset interaktiot.**

Moduulien sisältämät biologiset reitit taulukoitiin (Liite 4-7) ja havaittiin, että moduulin 1 funktiot liittyvät pääasiassa lipidimetaboliaan, moduulin 2 funktiot osallistuvat solukalvon toimintaan, moduulin 3 funktiot käsittelevät solunjakautumista ja moduulin 4 funktiot liittyvät vahvasti immuunipuolustukseen.

Moduulit 3 ja 4 osoittautuivat tässä vertailussa tärkeimmiksi. Sata merkittävintä (pienin p-arvo) analyysissa käytettyä geeniä löytyivät moduuleista 3 ja 4. Merkittävimmät biologiset reitit löytyivät myös näistä kahdesta moduulista. Moduuleiden välillä on paljon interaktioita, mutta niihin kuuluviin geeneihin liittyvät biologiset reitit eroavat silti toisistaan selkeästi.

## 7 Pohdinta

Tässä tutkimuksessa analysoitiin psoriaattisen ihon genominlaajuista transkriptomia bioinformaattisilla menetelmillä. Tavoitteena oli selvittää, millä tavalla psoriaatikon läiskäinen ja ulkoisesti terve iho eroavat geenien ilmentymisen suhteen toisistaan. Tavoitteena oli myös tarkastella, miten psoriaatikon läiskätön iho eroaa terveestä kontrolli-ihosta. Geenien ilmentymiserojen, geeniverkostojen ja niihin liittyvien biologisten prosessien avulla pyrittiin selvittämään psoriaasiin liittyviä tautiprosesseja.

Psoriaasin transkriptomia selvittäviä tutkimuksia on tehty aikaisemmin niin mikrosiruja (29-34) kuin RNA-sekvensointiakin (RNA-seq) (35-37) käyttämällä. Näiden tuloksien kokoaminen ja vertailu tämän tutkimuksen tuloksiin muodostaa kokonaisvaltaisemman kuvan psoriaasin patogeneesistä sekä ottaa kantaa aikaisempien ja tämän tutkimuksen luotettavuuteen.

Aikaisemmat tutkimukset ovat painottuneet enimmäkseen psoriaasin transkriptomin määrittämiseen vertailemalla läiskäistä ihoa joko läiskättömään tai terveeseen kontrolliin. Huomataan myös, että potilasmäärät ovat olleet pienempiä (taulukko 1), joka lisää tuloksessa sattuman mahdollisuutta, joten tarkempi tutkimus suuremmalla näyttemäärällä lisää luotettavuutta. Tässä tutkimuksessa on vertailtu kaikkia kolmea ryhmää (läiskätön, läiskäinen ja terve kontrolli) keskenään käyttämällä potilasaineistoa, joka on tähän mennessä suurin psoriaasin transkriptomitutkimuksessa käytetty alkuperäinen aineisto.

	<b>Läiskäinen</b>	<b>Läiskätön</b>	<b>Terve</b>
Bowcock et al (2001) (29)	14	13	6
Zhou et al (2003) (30)	16	16	8
Yao et al (2008) (31)	31	26	21
Gudjonsson et al (2009) (32)	58	58	64
Suárez-Fariñas et al (2010) (34)	15	15	-
Jabbari et al (2012) (35)	3	3	-
Li et al (2014) (36)	92	-	82
Keermann et al (2015) (37)	12	12	12
<b>tässä tutkimuksessa</b>	<b>108</b>	<b>97</b>	<b>98</b>

**Taulukko 1. Tutkimuksissa käytettyjen näytteiden määrät.**

Zhou et al. tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat pääosin samoja kuin Bowcock et al. tutkimuksessa. Li et al. 42 näytettä samoja kuin Gudjonsson et al. tutkimuksessa.

Mikrosiruja (mm. Affymetrix) on käytetty psoriaasin transkriptomitutkimuksissa jo pitkään ja viime aikoina tämän rinnalle on tullut myös RNA-sekvensointi. Mikrosiruilla havaitut DEG:t ja FC:t vastaavat hyvin RNA-seqillä saatuja arvoja, mutta variaatiota nähdään matalammin ilmentyvien geenien kohdalla. (36, 38) RNA-seq:lla havaitaan matalammin ilmentyvät geenit, joka nostaa näiden FC-arvoja ja lisää kokonaisuudessaan DEG:ien määrää. Tämä huomattiin myös sekä Jabbari et al. että Li et al. tutkimuksissa, jossa vertailtiin saatuja RNA-seq tuloksia mikrosirutuloksiin, joissa oli käytetty samoja näytteitä. (35, 36) Kuitenkin suurin osa RNA-seq menetelmällä havaituista DEG:eistä ovat tälle menetelmälle spesifejä, joten jatkoanalyysissä on myös eroja. Tässä vertailtavissa tutkimuksissa käytetyt metodit voidaan nähdä taulukosta 2.

Tuloksia voidaan vertailla myös analyysissä käytettyjen raja-arvojen suhteen. Näissä tutkimuksissa on suurimmaksi osaksi käytetty raja-arvoina  $FC > 2$  sekä  $p\text{-arvo} < 0,05$ . Tämä tarkoittaa, että vain kaksinkertaisesti enemmän tai vähemmän ilmentyvät geenit määritellään eri tavalla ilmentyviksi. Tässä tutkimuksessa käytimme FC raja-arvoa 1,5, jotta myös pienemmällä erotuksella ilmentyvät geenit huomioitaisiin. P-arvolle asetettiin kuitenkin tiukempi raja-arvo, jotta väärin positiivisten määrä DEG:eissä olisi mahdollisimman pieni.

	<b>FC</b>	<b>p/q-arvo, FDR</b>	<b>Metodi</b>
Bowcock et al (2001) (29)	$> 2^*$	-	Affymetrix-siru
Zhou et al (2003) (30)	$> 2$	$< 0,05$	Affymetrix-siru
Yao et al (2008) (31)	$> 2$	$< 0,05$	Affymetrix-siru
Gudjonsson et al (2009) (32)	$> 1.3 / > 2$	$< 0,05$	Affymetrix-siru
Gudjonsson et al (2010) (33)	$> 2$	$< 0,05$	Affymetrix-siru
Suárez-Fariñas et al (2010) (34)	$> 2$	$< 0,05$	Affymetrix-siru
Jabbari et al (2012) (35)	$> 1,5$	$< 0,1$	RNA-seq Illumina/ Affymetrix-siru
Li et al (2014) (36)	1	FWER $< 0,025$	RNA-seq Illumina
Keermann et al (2015) (37)	$> 1,5^{**}$	$< 0,1$	RNA-seq SOLiD
<b>tässä tutkimuksessa</b>	<b><math>&gt; 1,5</math></b>	<b><math>&lt; 0,01</math></b>	<b>Affymetrix-siru</b>

**Taulukko 2. DEG-analyysissä käytetyt arvot sekä metodi, jolla data on muodostettu.**

\*) ei selkeästi pääteltävissä julkaisusta

\*\*) tutkimuksessa käytetty logFC arvoa 0,5, mutta tämä on pyöristetty tekstissä 1,5 FC

Vaikka analyysissä käytetään väriä positiivisia pois sulkevia raja-arvoja, kuten p-arvoa, tulisi tulokset korjata myös erilaisten näytteiden käsittelyssä mahdollisesti esiintyvien teknisten virhelähteiden sekä näytteiden antaneiden henkilöiden tai näytteenottopaikan mukaan. Verrattavista tutkimuksista muutama oli käyttänyt lineaarista mallia (limma)

(39) sekä Benjamini-Hochberg korjausta, joita oli käytetty myös tässä tutkimuksessa. (34, 35, 37) Zhou et al. oli käyttänyt DEG:ien määrittämiseen t-testiä sekä k-means ryhmittelyä (engl. k-means clustering). (30) Myös Bowcock et al. käytti k-means ryhmittelyä. (29) Yoa et al. ilmoittivat käyttäneensä r-kielen paketteja ”samr” sekä ”qvalue”, mutta tarkempia korjausmenetelmiä ei spesifioitu. (31) Gudjonsson et al. määrittivät käyttämänsä FDR-arvon permutaatiomenetelmän avulla. (32) Myöhemmässä tutkimuksessaan Gudjonsson et al. määrittivät geenit käyttämällä t-testiä. (33) Li et al. tutkimuksessa p-arvon määrittämiseen käytettiin Wilcoxon rank-sum -testiä. (36) Keermann et al. määrittivät DEG:t läiskäisen ihon ja läiskättömän ihon vertailussa käyttämällä ”GLM likelihood ratio” -testiä ja läiskäisen sekä läiskättömän ihon vertailussa kontrolliin käytettiin negatiivista binominaalista sovitusta sekä tämän jälkeen tarkkaa testiä (engl. exact test). (37)

Vertailussa käytettyjen tutkimusten DEG:ien määrät on taulukoitu ryhmän mukaan (taulukko 3). Havaittujen geenien määrät riippuvat siitä, millä menetelmällä geenien ilmentyminen on havaittu (mikrosiru, RNA-seq), kuinka monta potilasta/näytettä tutkimuksessa on käytetty, mitä ryhmiä on vertailtu ja minkälaisia analyysimenetelmiä on käytetty. DEG:ien määrän ja merkitsevyyksien erot vaikuttavat näiden pohjalta muodostettujen biologisten reittien listoihin. Tässä tutkimuksessa DEG:ien määrät olivat PSO\_LES-CTRL\_NL sekä PSO\_LES-PSO\_NL vertailuissa hieman suurempia (2504 ja 2235 kpl) kuin aikaisemmissa tutkimuksissa, joka voi selittyä sekä suuremmalla näytemäärällä että matalammalla käytetyllä FC:llä. PSO\_NL-CTRL\_NL vertailussa geenien (15 kpl) määrä oli huomattavasti matalampi kuin muissa tutkimuksissa. Ero voi mahdollisesti johtua erilaisten virhelähteiden korjausmenetelmien puutteesta sekä aikaisempien tutkimusten pienestä näytekoota.

Tässä tutkimuksessa psoriaatikon läiskäisen ja terveen ihon (PSO\_LES-CTRL\_NL) välisessä vertailussa tärkeimmät esille nousseet biologiset reitit liittyivät erilaisiin immunologisiin prosesseihin: granulosyyttien sekä agranulosyyttien adheesio ja diapedeesi, interferoni signaalointi sekä tyypin I interferonin signaalointireitti, jotka kaikki liittyvät vahvasti psoriaasille tyypilliseen immunologiseen profiiliin. (12, 31, 40) Enrich R tuloksissa havaitaan erilaisia ihon erilaistumiseen liittyviä reittejä, jotka voidaan yhdistää psoriaasille tyypillisiin erilaistumisen muutoksiin. (12) IPA:n analyysissa



merkittävimpänä reittinä nähdään ateroskleroottinen signalointi, joka tukee aikaisempaa käsitystä siitä, että psoriaasi on yhteydessä korkeampaan sydän- ja verisuonisairauksien riskiin. (41) Tämän tutkimuksen havainnot vastaavat hyvin aikaisempia tutkimuksia, joissa läiskäisen ja terveen kontrolli-ihon vertailun DEG:ien biologiset prosessit käsittelivät immuunivastetta, sytokiinin toimintaa, solunjakautumista, keratinisaatiota sekä reaktiota haavoihin ja patogeeneihin sekä ihon toimintaan. (30, 33, 36, 37) Gudjonsson et al. tutkimuksessa ali-ilmentyneiden geenien nähtiin liittyvän mm. lipidimetaboliaan. (33) Näitä tuloksia vahvistavat myös tämän tutkimuksen INFORM-analyysissä muodostetut neljä moduulia, joiden geenit liittyivät immuunipuolustukseen, solunjakautumiseen, lipidimetaboliaan sekä solukalvon toimintaan.

	↑			↓			yht		
	L vs C	L vs NL	NL vs C	L vs C	L vs NL	NL vs C	L vs C	L vs NL	NL vs C
Bowcock et al (2001) (29)	161	-	-	16	-	-	177	-	-
Zhou et al (2003) (30)	714	498	197	208	362	8	922	860	205
Yao et al (2008) (31)	2016*	1408*	460*	2262*	1465*	489*	4278*	2873*	949*
Gudjonsson et al (2009) (32)	-	-	58	-	-	121	-	-	179
Gudjonsson et al (2010) (33)	549	506**	59	369	249**	120	918	758	179
Suárez-Fariñas et al (2010) (34)	-	579	-	-	703	-	-	1282	-
Jabbari et al (2012) (35)	1262/303	-	-	1367/266	-	-	2629/569	-	-
Li et al (2014) (36)	1049	-	-	2528	-	-	3577	-	-
Keermann et al (2015) (37)	-	-	-	-	-	-	5853	4262	970
<b>tässä tutkimuksessa</b>	<b>1293</b>	<b>1181</b>	<b>13</b>	<b>1211</b>	<b>1054</b>	<b>2</b>	<b>2504</b>	<b>2235</b>	<b>15</b>

### Taulukko 3. DEG:ien määrät eri tutkimuksissa.

Nuoli ylöspäin kuvaa yli-ilmentyviä ja alaspäin ali-ilmentyviä geenejä. L viittaa läiskäiseen NL läiskättömään ja C terveeseen kontrolli-ihon.

\*) Yao et al. käytti tutkimuksessaan koetinryhmiä (engl. probegroup), joiden määrä ei suoraan vastaa havaittujen geenien määrää.

\*\*) Gudjonsson et al (2010) tutkimuksessa kyseisten ryhmien geenien määrät eivät vastaa artikkelin leipätekstissä ilmoitettua yhteismäärää, joka on merkitty tähän taulukkoon.

Jabbari et al. samoista näytteistä oli määritelty differentiaaliyksipressoituvat geenit sekä RNA-skvensoinnilla että mikrosiruilla. Tässä ilmoitetaan määrät RNA-seq/mikrosiru. Huomataan, että RNA-seq geenien määrä on kaikissa ryhmissä suurempi.

Läiskätön iho kuvaa psoriaatikon tervettä ihoa eikä se eroa ulkoisesti terveen kontrollihenkilön ihosta. Samanlaisuutta on pyritty havainnollistamaan myös vertaamalla psoriaatikon läiskäistä ihoa terveeseen kontrolliin (PSO\_LES-CTRL\_NL) ja psoriaatikon läiskättömään (PSO\_LES-PSO\_NL) ihoon. Tuloksien perusteella voidaan sanoa, että psoriaatikon läiskätön iho vastaa transkriptomiltaan hyvin läheisesti terveen kontrollin ihoa, koska molempien vertailuiden tulokset ovat keskenään erittäin samankaltaisia. DEG:t ovat suurimmilta osin samoja molemmissa vertailuissa sekä biologiset reitit ovat lähes identtisiä. Tian et al. suorittivat meta-analyysin käyttäen kolmea psoriaatikon

läiskäistä ja läiskätöntä ihoa vertaavaa tutkimusta. (42) Meta-analyysin IPA:lla määritellyt tärkeimmät reitit vastasivat hyvin tässä tutkimuksessa havaittuja reittejä, kun verrataan psoriaatikon läiskäistä ihoa läiskättömään sekä kun läiskäistä verrataan terveeseen kontrolliin. (42)

Psoriaatikon läiskättömän ihon transkriptomin on havaittu eroavan terveestä kontrolli-ihosta myös muissa tutkimuksissa. (30-32) Zhou et al. löysivät läiskättömän ja terveen kontrolli-ihon vertailussa 205 DEG:iä, joihin liittyviä biologisia reittejä olivat eksosytoosi, epidermaalinen erilaistuminen, solun järjestäytyminen ja biogeneesi sekä melaniinin biosynteesi. (30) Yao et al. tutkimuksessa havaittiin 949 eri tavalla ilmentyvää koetinryhmää, joista suurin osa oli tälle vertailulle spesifejä. (31) Gudjonsson et al. havaitsemat DEG:t olivat rikastuneet biologisissa reiteissä, jotka liittyivät epidermaalisolujen erilaistumiseen, keratinisaatioon sekä puolustusvasteeseen. (32) Gudjonsson et al. tutkimuksessa nähtiin geeni-ilmentymisen vähitellen lisääntyvän normaalista läiskättömään ja edelleen läiskäiseen tietyissä geeneissä (mm. S100A8, S100A9, S100A7, SPRR2B, SPRR2G) sekä vähenevän lipidimetaboliaan liittyvien geenien ilmentymisessä. (32)

Tässä tutkimuksessa havaitut 15 geeniä eivät olleet PSO\_NL-CTRL\_NL vertailulle spesifejä vaan kaikki löytyivät myös PSO\_LES-CTRL\_NL vertailun geenilistasta (Kuva 5). Näistä 15 geenistä mm. C10orf99, S100A7, S100A8, S100A9, SPRR2B, SPRR2G ovat merkittäviä geenejä psoriaasin patogeneesissä (43-46) ja vastasivat myös Gudjonsson et al. tutkimuksessa löydettyjä geenejä (32). Keermann et al. tutkimuksessa S100A8 sekä SPRR2B oli kuitenkin liitetty vain läiskäisen ja kontrolli-ihon vertailuun eikä näitä havaittu läiskättömän ja kontrolli-ihon vertailussa. (37)

Läiskättömän ja kontrolli-ihon vertailussa IPA:n merkittävin reitti oli IL-17A:n rooli psoriaasissa. IL-17 liittyviä reittejä havaittiin useampia ja muut reitit liittyivät myös erilaisiin immunologisiin prosesseihin. Sekä Pantherin että Enrich R:n reitit liittyivät tulehdussolujen aggregaatioon sekä solukuolemaan, ja Enrich R:n -analyysissä korostuivat epidermoksen erilaistumiseen sekä keratinosyytteihin liittyvät reitit. Tulokset vastaavat hyvin aikaisempia tutkimuksia ja pystyttiin havaitsemaan psoriaasin patogeneesiin liittyviä merkittäviä reittejä suuresta potilasaineistosta muodostetusta ja tiukoin raja-arvoin käsitellystä aineistosta.

IL-17 rooli psoriaasin patogeenisissä on merkittävä ja sen estoon liittyviä biologisia lääkkeitä käytetään psoriaasin hoidossa. (47, 48) Psoriaasin patogeenisissä keratinosyyttien aktivoituminen mm. vaurion seurauksena johtaa Th1 sekä Th17 solujen siirtymiseen läiskän alueelle. Th17-solut tuottavat IL-17, joka osallistuu psoriaasin patogeenisiin aktivoimalla kemokiinejä, jotka lisäävät edelleen neutrofiilien sekä T-solujen kulkeutumista alueelle. (14) Myös mm. epiteelin  $\gamma\delta$ -T-solut, neutrofiilit ja makrofagit tuottavat IL-17:ta. (11, 14) IL-17 on liitetty läiskättömään ihoon myös aiemmissa tutkimuksissa. (37, 49)

Tämän tutkimuksen tulokset vastasivat kaiken kaikkiaan hyvin aikaisemmissa tutkimuksissa saatuja tuloksia, mutta siinä käytettiin suurempaa potilasmäärää, tiukempia suodattimia ja tehokkaampaa datan käsittelyä. Useammalla biologisten reittien määrityksien metodilla muodostettiin yksityiskohtaisempi kuva geeneistä, jotka liittyvät psoriaasin patogeenisiin. Näillä menetelmillä vahvistettiin myös aikaisempia läiskättömän ja terveen ihon tutkimustuloksia sekä IL-17:n merkitystä psoriaatikon läiskättömässä ihossa.

Psoriaasiin liittyvien geenien ilmentyminen myös läiskättömällä alueella herättää kysymyksen siitä, miten ja missä vaiheessa ilmentymisen taso on muuttunut. IL-17 on havaittu psoriaatikoiden verinäytteissä ja lisääntyneen IL-17 ilmentymisen on ajateltu mahdollisesti johtuvan tästä. (50) (49) Tässäkin tutkimuksessa ihobiopsiat otettiin henkilöiltä, joilla tauti oli jo puhjennut, joten olisi mielenkiintoista selvittää, missä vaiheessa ilmentyminen muuttuu ennen kuin psoriaasille tyypilliset läiskät muodostuvat. Tällainen tutkimus olisi kuitenkin hankala, koska psoriaasin tarkkaa patogeenisiä ei vielä tiedetä. Mahdollisia tutkimuksia voitaisiin suorittaa koe-eläimillä, mutta varsinaisesti psoriaasia esiintyy vain ihmisillä. Tautia voidaan mallintaa muuntogeenisillä eläimillä sekä aiheuttamalla psoriaasin kaltainen tauti vaikuttamalla erilaisiin signaalireitteihin. (51) Nämäkään mallit eivät kuitenkaan täysin vastaa ihmisellä havaittavaa psoriaasia.

Lisää mikrosiruja ja RNA-sekvensointia hyödyntäviä tutkimuksia tulisi tehdä suuremmalla näytemäärällä, joka kattaisi suuremman osan väestöstä. Analyyseissä tulisi myös kiinnittää huomiota FDR-arvojen huolelliseen korjaukseen mahdollisten virhelähteiden osalta. Näin voitaisiin lisätä tutkimustulosten luotettavuutta entisestään.

## Lähdeluettelo

- (1) Mescher AL. Skin. 2013. In: Junqueira's Basic histology Text and Atlas [Internet]. McGraw-Hill Education. 13th . [364-84].
- (2) Tasanen-Määttä K, Peltonen S. Dermis eli verinahka. 2011. In: Ihotaudit [Internet]. Kustannus Oy Duodecim.
- (3) Tasanen-Määttä K, Peltonen S. Epidermis eli orvaskesi. 2011. In: Ihotaudit [Internet]. Kustannus Oy Duodecim.
- (4) Basler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release*. 2016;242:105-18.
- (5) Basler K, Brandner JM. Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Arch*. 2017;469(1):3-14.
- (6) Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(9):565-80.
- (7) Murphy K, Weaver C. Janeway's immunobiology. 9th edition. ed. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC; 2016. xx, 904 pages p.
- (8) Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. Robbins basic pathology. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013. xii, 910 p. p.
- (9) Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(10):978-85.
- (10) Hannuksela-Svahn A. Psoriaasi-Ydintieto. 2011. In: Ihotaudit [Internet]. Kustannus Oy Duodecim.
- (11) Boehncke WH, Schon MP. Psoriasis. *Lancet*. 2015;386(9997):983-94.
- (12) Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(5):496-509.
- (13) Hannuksela-Svahn A. Taudinkuva. 2011. In: Ihotaudit [Internet]. Kustannus Oy Duodecim.
- (14) Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(8).
- (15) Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol*. 2007;25(6):606-15.
- (16) Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007;370(9583):263-71.
- (17) Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(6):982-6.
- (18) Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):917-28.
- (19) Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(5):273-9.
- (20) Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010;130(5):1373-83.

- (21) Psoriaasi (iho ja nivelet). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Ihotautilääkäriyhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2017 (viitattu pp.kk.vvvv). Saatavilla internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi).
- (22) Harper RA. Specificity in the synergism between retinoic acid and EGF on the growth of adult human skin fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1988;178(2):254-63.
- (23) Warren RB, Griffiths CE. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. *Clin Dermatol.* 2008;26(5):438-47.
- (24) Monni O, Hautaniemi S, Kallioniemi O. [Gene chip technique and associated bioinformatics]. *Duodecim.* 2002;118(11):1157-66.
- (25) Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
- (26) Marwah VS, Scala G, Kinaret PAS, Serra A, Alenius H, Fortino V, et al. eUTOPIA: solUTion for Omics data Preprocessing and Analysis. *Source Code Biol Med.* 2019;14:1.
- (27) Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* 2016;13(9):731-40.
- (28) Marwah VS, Kinaret PAS, Serra A, Scala G, Lauerma A, Fortino V, et al. INfORM: Inference of NetwOrk Response Modules. *Bioinformatics.* 2018;34(12):2136-8.
- (29) Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, et al. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet.* 2001;10(17):1793-805.
- (30) Zhou X, Krueger JG, Kao MC, Lee E, Du F, Menter A, et al. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics.* 2003;13(1):69-78.
- (31) Yao Y, Richman L, Morehouse C, de los Reyes M, Higgs BW, Boutrin A, et al. Type I interferon: potential therapeutic target for psoriasis? *PLoS One.* 2008;3(7):e2737.
- (32) Gudjonsson JE, Ding J, Li X, Nair RP, Tejasvi T, Qin ZS, et al. Global gene expression analysis reveals evidence for decreased lipid biosynthesis and increased innate immunity in uninvolved psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 2009;129(12):2795-804.
- (33) Gudjonsson JE, Ding J, Johnston A, Tejasvi T, Guzman AM, Nair RP, et al. Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *J Invest Dermatol.* 2010;130(7):1829-40.
- (34) Suarez-Farinas M, Lowes MA, Zaba LC, Krueger JG. Evaluation of the psoriasis transcriptome across different studies by gene set enrichment analysis (GSEA). *PLoS One.* 2010;5(4):e10247.
- (35) Jabbari A, Suarez-Farinas M, Dewell S, Krueger JG. Transcriptional profiling of psoriasis using RNA-seq reveals previously unidentified differentially expressed genes. *J Invest Dermatol.* 2012;132(1):246-9.
- (36) Li B, Tsoi LC, Swindell WR, Gudjonsson JE, Tejasvi T, Johnston A, et al. Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2014;134(7):1828-38.

- (37) Keermann M, Koks S, Reimann E, Prans E, Abram K, Kingo K. Transcriptional landscape of psoriasis identifies the involvement of IL36 and IL36RN. *BMC Genomics*. 2015;16:322.
- (38) Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res*. 2008;18(9):1509-17.
- (39) Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47.
- (40) Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. 2005;202(1):135-43.
- (41) Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB, Gelfand JM. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(5):829-35.
- (42) Tian S, Krueger JG, Li K, Jabbari A, Brodmerkel C, Lowes MA, et al. Meta-analysis derived (MAD) transcriptome of psoriasis defines the "core" pathogenesis of disease. *PLoS One*. 2012;7(9):e44274.
- (43) Chen C, Wu N, Duan Q, Yang H, Wang X, Yang P, et al. C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes. *Sci Rep*. 2018;8(1):8590.
- (44) Hardas BD, Zhao X, Zhang J, Longqing X, Stoll S, Elder JT. Assignment of psoriasin to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1996;106(4):753-8.
- (45) Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wculek SK, Ruppen I, Ximenez-Embun P, Guio-Carrion A, et al. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity*. 2013;39(6):1171-81.
- (46) Ekman AK, Vegfors J, Eding CB, Enerback C. Overexpression of Psoriasin (S100A7) Contributes to Dysregulated Differentiation in Psoriasis. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(4):441-8.
- (47) Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1207-11.
- (48) Kurschus FC, Moos S. IL-17 for therapy. *J Dermatol Sci*. 2017;87(3):221-7.
- (49) Chiricozzi A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Cueto I, Li K, Tian S, et al. Increased expression of interleukin-17 pathway genes in nonlesional skin of moderate-to-severe psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol*. 2016;174(1):136-45.
- (50) Wang CQF, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Mimoso CA, Shrom D, Dow ER, et al. IL-17 induces inflammation-associated gene products in blood monocytes, and treatment with ixekizumab reduces their expression in psoriasis patient blood. *J Invest Dermatol*. 2014;134(12):2990-3.
- (51) Gudjonsson JE, Johnston A, Dyson M, Valdimarsson H, Elder JT. Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1292-308.

## Liitteet

Liitteet 1-2 sisältävät tässä tutkimuksessa käytettyjen vertailujen PSO\_LES-CTRL\_NL ja PSO\_LES-PSO\_NL 50 merkittävintä eri tavalla ilmentynyttä geeniä. Liite 3 sisältää PSO\_NL-CTRL\_NL vertailun DEG-listan kokonaisuudessaan. Geenilistat on järjestetty nousevaan järjestykseen säädetyn P-arvon mukaisesti. Kaikki täydelliset geenilistat ovat saatavilla pyydettäessä.

Liitteet 4-7 sisältävät tässä tutkimuksessa käytettyjen eri vertailujen (PSO\_LES CTRL\_NL, PSO\_LES-PSO\_NL ja PSO\_NL-CTRL\_NL) INfORM-geeniverkosto-analyysin 25 merkittävintä biologista reittiä. Geenilistat on järjestetty nousevaan järjestykseen P-arvon mukaisesti. Täydelliset biologisten reittien listat ovat saatavilla pyydettäessä.

## Liite 1

## PSO\_LES-CTRL\_NL

logFC	AveExpr	t-statistic	P.Value	adj.P.Val	B-statistic	score	Symbol
6.507687435	5.846545002	60.69945365	3.8744E-165	1,22E-160	366.8747705	2463.62929	S100A12
3.697420025	5.691236318	56.7250478	2.1767E-157	3,43E-153	349.2236089	1333.763073	KYNU
6.712209202	4.747006309	55.54386455	5.3591E-155	5,63E-151	343.7711262	2384.323713	S100A7A
5.148340085	5.464431365	52.70296298	4.5468E-149	3,58E-145	330.2420549	1758.522409	TMPRSS11D
3.46586892	7.907703679	51.31260269	4.518E-146	2,85E-142	323.3967933	1159.920097	PLA2G4D
7.66536467	6.698598126	50.90316844	3.5487E-145	1,86E-141	321.3517809	2549.563574	SPRR2F
4.18191964	7.143133458	50.58503038	1.7766E-144	8,00E-141	319.7534197	1384.20512	IL36G
6.357693685	6.26832089	50.24518969	1.0017E-143	3,95E-140	318.0369064	2093.384891	TCN1
4.828515363	6.655794374	48.93928153	8.4198E-141	2,95E-137	311.3517075	1557.359939	LCE3A
8.212869716	5.779138464	48.74177973	2.3603E-140	6,77E-137	310.3281409	2640.46337	DEFB4A/DEFB4B
4.203838955	6.333913563	48.74346312	2.3396E-140	6,77E-137	310.3368793	1351.5844	AKR1B10
5.879748159	5.589394296	48.32337345	2.1186E-139	5,57E-136	308.1486746	1877.453916	IL36A
3.293329687	6.66836696	47.6237913	8.5933E-138	2,08E-134	304.4706533	1039.393801	PRSS27
6.754299756	7.915880948	45.39624174	1.5111E-132	3,40E-129	292.4682172	2050.121822	PI3
4.11463182	7.618421466	44.2279023	1.021E-129	2,15E-126	285.9893664	1222.097858	C10orf99
1.997157003	10.84051976	44.1646328	1.4583E-129	2,87E-126	285.6347993	592.4689519	CNFN
2.032762387	9.25382684	43.5479194	4.8061E-128	8,91E-125	282.158376	595.9266713	TGM1
5.547747313	6.429572858	42.41067177	3.3344E-125	5,84E-122	275.6495546	1590.088896	HEPHL1
2.709216503	7.048924594	41.14009627	5.8023E-122	9,63E-119	268.2232526	756.2970946	KLK13
2.174896752	8.331319589	40.37203473	5.7195E-120	9,02E-117	263.6529307	597.1534353	SERPINB13
1.213598995	7.812446493	40.27798177	1.0077E-119	1,51E-116	263.0889973	332.5260588	SPTLC2
2.461647772	6.910743916	39.67648943	3.855E-118	5,53E-115	259.4601853	665.5204131	HPSE
1.898460879	6.000138661	39.4896484	1.2052E-117	1,65E-114	258.3250589	511.0956959	EPHB2
5.781836561	7.948579189	38.69841125	1.5685E-115	2,06E-112	253.4759221	1528.412021	S100A9
2.287212891	7.730196659	38.55369337	3.8496E-115	4,86E-112	252.5815813	602.5646743	GDPD3
1.615856449	4.791800753	38.50150526	5.3244E-115	6,46E-112	252.2584964	425.1721938	ABCG4
3.163674676	7.151827355	38.46414583	6.7172E-115	7,84E-112	252.0270274	831.7067064	ACP7
6.6200683	6.313657789	37.78154618	4.817E-113	5,42E-110	247.7704549	1712.08184	SPRR2B
1.710082704	7.394227209	37.67651459	9.3387E-113	1,01E-109	247.1108612	441.1294229	MPZL2
2.062105042	6.646376161	37.67154733	9.636E-113	1,01E-109	247.0796362	531.8717572	FCHSD1
1.917832961	7.735436206	37.59286947	1.5836E-112	1,61E-109	246.5846837	493.7074444	ARNTL2
1.460725943	6.736810876	37.49356933	2.9673E-112	2,92E-109	245.9590003	375.1171838	NOD2
1.0064708	9.374477252	37.46436387	3.5699E-112	3,41E-109	245.7747662	258.2775077	PGM2
2.341251237	7.239188956	37.38250695	5.9972E-112	5,56E-109	245.2578808	599.5903285	TYMP
4.206515185	6.510286836	37.01537841	6.2001E-111	5,59E-108	242.9302737	1067.455302	RHCG
1.720492332	9.894570864	36.91608429	1.1692E-110	1,02E-107	242.2981016	435.504784	NAMPTP1
2.476755803	8.07533886	36.88251688	1.4493E-110	1,24E-107	242.0841337	626.4044567	ZC3H12A
1.591614965	8.347077225	36.72986422	3.854E-110	3,20E-107	241.1094519	400.9839019	SLC5A1
2.04100477	8.321393521	36.69967739	4.6779E-110	3,78E-107	240.9163928	513.8056451	CRABP2
3.296975933	5.940614343	36.33032807	5.0478E-109	3,98E-106	238.5457119	822.1432139	ARSF
4.446343507	6.276723306	36.32321041	5.2854E-109	4,06E-106	238.4998719	1108.548252	GDA
-0.706573448	9.225752585	-36.28400133	6.8102E-109	5,11E-106	238.2472475	-175.9815568	SPTAN1
1.220801242	8.124308019	36.23695405	9.233E-109	6,77E-106	237.9438859	303.6852837	PPARD
-1.680677924	7.390451346	-35.93438517	6.5781E-108	4,71E-105	235.9867581	-414.7836426	SNTB1
2.464529384	10.0546592	35.902545	8.093E-108	5,67E-105	235.7801826	607.7238431	GJB2
1.660018342	7.756739146	35.57972058	6.6612E-107	4,57E-104	233.6790225	405.8417809	ADAP2
1.897766656	9.333523595	35.56173066	7.4942E-107	5,03E-104	233.5615716	463.7429601	ALOX12B
1.915547782	5.789630763	35.4624551	1.4368E-106	9,44E-104	232.9127451	466.8412241	WNT5A
1.465838565	9.20736174	35.43189991	1.7559E-106	1,13E-103	232.7128143	356.9478834	PLBD1
-2.542089255	5.484594903	-35.40824507	2.051E-106	1,29E-103	232.5579586	-618.6319258	BTC



## Liite 2

## PSO\_LES-PSO\_NL

logFC	AveExpr	t-statistic	P.Value	adj.P.Val	B-statistic	score	Symbol
6.158368631	5.846545002	67.60156575	1.2923E-177	4,07E-173	395.5458379	2508.310666	S100A12
3.53598702	5.691236318	63.84394583	5.7357E-171	9,04E-167	380.4097407	1386.090441	KYNU
5.083094349	5.464431365	61.23912155	3.7109E-166	3,90E-162	369.4414506	1936.241415	TMPRSS11D
6.197158803	4.747006309	60.35263154	1.766E-164	1,39E-160	365.6143865	2336.671106	S100A7A
3.322797248	7.907703679	57.89602256	1.0186E-159	6,42E-156	354.7460734	1216.45145	PLA2G4D
7.335282071	6.698598126	57.32733996	1.3629E-158	7,16E-155	352.1732348	2666.366303	SPRR2F
6.151325249	6.26832089	57.21324203	2.2994E-158	1,04E-154	351.654385	2232.782198	TCN1
5.691290826	5.589394296	55.04809261	5.5642E-154	2,19E-150	341.6367245	2008.352679	IL36A
3.854007008	7.143133458	54.8645484	1.3292E-153	4,66E-150	340.7721732	1356.652671	IL36G
7.818172361	5.779138464	54.60654092	4.5391E-153	1,43E-149	339.5527322	2742.480264	DEFB4A/DEFB4B
4.572680756	6.655794374	54.54410633	6.1145E-153	1,75E-149	339.2569117	1602.655384	LCE3A
3.144848975	6.66836696	53.52066837	8.4112E-151	2,21E-147	334.3666932	1086.736478	PRSS27
3.863705827	6.333913563	52.72387736	4.1031E-149	9,95E-146	330.5049436	1320.125642	AKR1B10
1.899282107	10.84051976	49.42934667	6.6167E-142	1,49E-138	314.0077592	617.4138623	CNFN
1.903518261	9.25382684	47.99221765	1.2162E-138	2,56E-135	306.530811	604.4832429	TGM1
1.207883839	7.812446493	47.17920741	9.2404E-137	1,82E-133	302.2217259	378.3461477	SPTLC2
2.623835561	7.048924594	46.89118216	4.345E-136	8,06E-133	300.6811011	817.8037317	KLK13
1.906621224	6.000138661	46.67442911	1.3997E-135	2,45E-132	299.516804	592.0301509	EPHB2
2.112612783	8.331319589	46.15246201	2.382E-134	3,95E-131	296.6956079	650.0054107	SERPINEB13
5.81180324	7.915880948	45.97094684	6.4195E-134	1,01E-130	295.7087121	1782.404867	PI3
4.949680293	6.429572858	44.53163131	1.8537E-130	2,78E-127	287.7748582	1478.56294	HEPHL1
3.078919878	7.151827355	44.05504393	2.7067E-129	3,88E-126	285.1046228	911.4765141	ACP7
2.294852873	6.910743916	43.53064996	5.3031E-128	7,27E-125	282.1411921	672.5355695	HPSE
4.187283794	6.510286836	43.36357763	1.376E-127	1,81E-124	281.191407	1223.14392	RHCG
2.048169406	8.321393521	43.34281143	1.5494E-127	1,95E-124	281.0731625	598.0459141	CRABP2
3.379006677	7.618421466	42.74520339	4.803E-126	5,82E-123	277.6520767	975.0342924	C10orf99
1.645494709	7.394227209	42.66611232	7.5863E-126	8,86E-123	277.1966504	474.0660092	MPZL2
1.955251764	5.789630763	42.60018376	1.111E-125	1,25E-122	276.8165391	562.5608882	WNT5A
1.967560254	6.646376161	42.30227192	6.2623E-125	6,81E-122	275.0934884	562.6997786	FCHSD1
2.125433283	7.730196659	42.1638105	1.4031E-124	1,47E-121	274.2896159	606.1349883	GDPD3
1.498869607	4.791800753	42.03119749	3.044E-124	3,10E-121	273.5178776	426.2895765	ABCG4
2.356957031	4.580793962	41.55404104	5.0122E-123	4,94E-120	270.7262527	663.7334385	PRKCQ
2.406580659	10.0546592	41.25956391	2.8567E-122	2,73E-119	268.9917369	673.5194185	GJB2
1.625096762	7.756739146	40.99225863	1.3973E-121	1,30E-118	267.4094926	452.2290603	ADAP2
2.321547789	8.07533886	40.68627831	8.6779E-121	7,82E-118	265.5891749	641.7965636	ZC3H12A
1.158084189	8.124308019	40.45571044	3.4582E-120	3,03E-117	264.211003	318.553589	PPARD
1.098306299	5.05961821	40.3732081	5.6792E-120	4,84E-117	263.7164999	301.565692	TPBG
1.332064204	6.736810876	40.23890729	1.2754E-119	1,03E-116	262.9099854	364.67171	NOD2
-1.599160241	7.390451346	-40.23932466	1.2722E-119	1,03E-116	262.9124948	-437.7971121	SNTB1
2.140332378	7.239188956	40.21930865	1.4355E-119	1,13E-116	262.79213	585.6936998	TYMP
0.975522028	8.37818513	40.02510586	4.6419E-119	3,57E-116	261.6220936	265.8029262	ABCC1
1.857589542	7.5893667	39.98889844	5.7799E-119	4,34E-116	261.403506	505.73478	CARHSP1
0.620875874	9.520552643	39.66913646	4.0316E-118	2,96E-115	259.4669796	167.8295008	VCP
0.903965625	9.374477252	39.60062823	6.121E-118	4,39E-115	259.0506549	243.974276	PGM2
2.578993064	5.715681382	38.92653472	3.827E-116	2,68E-113	254.9270795	685.3875196	OASL
3.946860721	5.199148911	38.81683223	7.5363E-116	5,17E-113	254.2513184	1046.234383	SPRR2C
1.533876758	9.894570864	38.73346334	1.2624E-115	8,47E-113	253.7368876	405.808986	NAMPTP1
1.368877427	6.023983838	38.69807201	1.5718E-115	1,03E-112	253.518273	361.8559702	TTC39A
1.423852429	8.347077225	38.67045358	1.8653E-115	1,20E-112	253.3475763	376.1446191	SLC5A1
4.358924143	7.559044533	38.55931481	3.7175E-115	2,34E-112	252.6598296	1148.507795	LCE3E

### Liite 3

#### PSO\_NL-CTRL\_NL

logFC	AveExpr	t-statistic	P.Value	adj.P.Val	B-statistic	score	Symbol
1.655892154	10.35658451	10.17242865	6.10087E-21	1,92E-16	35.27161366	77.07491648	SPRR2G
1.591071149	10.35331272	9.474346357	1.0784E-18	1,70E-14	30.52658296	65.82428466	S100A7
0.701996513	6.006516948	8.466867615	1.34789E-15	1,42E-11	23.97973984	24.0365284	IFI27
0.735625144	7.618421466	7.72519519	1.90903E-13	1,50E-09	19.43028229	21.54425991	C10orf99
0.648000335	5.661089033	7.62407652	3.67055E-13	2,31E-09	18.82995119	18.55436541	TMC5
0.955982267	7.948579189	6.251218741	1.48076E-09	3,33E-06	11.21667409	19.43580108	S100A9
0.942496517	7.915880948	6.188805845	2.10176E-09	4,42E-06	10.89631238	18.83154282	PI3
1.011467267	6.313657789	5.639708081	4.09805E-08	6,46E-05	8.183844679	17.20523085	SPRR2B
0.661742643	6.557719126	5.456318887	1.05574E-07	0,000138702	7.321836329	10.63013687	CHI3L2
0.83056261	8.442308426	5.128668885	5.39666E-07	0,000436313	5.838923158	11.98694213	S100A8
-0.621980563	4.043820621	-5.131970286	5.31071E-07	0,000436313	5.853491916	-8.98660558	LOC646588
-0.590797777	3.319504148	-5.009016814	9.60484E-07	0,000688296	5.316124209	-8.185992988	LINC02527
0.931001095	6.526147462	4.826245328	2.27032E-06	0,001447155	4.537349224	12.09890763	CXCL10
1.121417267	8.211986469	4.601993959	6.30435E-06	0,003182616	3.615178214	13.42815461	SERPINB4
0.59806702	6.429572858	4.466793431	1.14561E-05	0,004816291	3.077297406	6.804202208	HEPHL1

### Liite 4

#### Walktrap\_1

GOID	TERM	ONTOLOGY	P_Value
GO:0010025	wax biosynthetic process	BP	1,5E-08
GO:0001676	long-chain fatty acid metabolic process	BP	3,2E-07
GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane	CC	7,1E-07
GO:0005777	peroxisome	CC	7,9E-07
GO:0047196	long-chain-alcohol O-fatty-acyltransferase activity	MF	1,5E-06
GO:0102966	arachidoyl-CoA:1-dodecanol O-acyltransferase activity	MF	1,5E-06
GO:0103095	wax ester synthase activity	MF	1,5E-06
GO:0005782	peroxisomal matrix	CC	2,7E-06
GO:0036155	acylglycerol acyl-chain remodeling	BP	1,2E-05
GO:0102391	decanoate-CoA ligase activity	MF	1,2E-05
GO:0005783	endoplasmic reticulum	CC	1,8E-05
GO:0031957	very long-chain fatty acid-CoA ligase activity	MF	2,3E-05
GO:0000038	very long-chain fatty acid metabolic process	BP	2,7E-05
GO:0001561	fatty acid alpha-oxidation	BP	2,7E-05
GO:0016829	lyase activity	MF	4,4E-05
GO:0004467	long-chain fatty acid-CoA ligase activity	MF	4,9E-05
GO:0035338	long-chain fatty-acyl-CoA biosynthetic process	BP	4,9E-05
GO:0006629	lipid metabolic process	BP	6,4E-05
GO:0005102	signaling receptor binding	MF	6,9E-05
GO:0070062	extracellular exosome	CC	8,1E-05
GO:0005779	integral component of peroxisomal membrane	CC	8,3E-05
GO:0019433	triglyceride catabolic process	BP	0,00015
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	BP	0,00026
GO:0006631	fatty acid metabolic process	BP	0,00051
GO:0030148	sphingolipid biosynthetic process	BP	0,00051

## Liite 5

### Walktrap\_2

GOID	TERM	ONTOLOGY	P_Value
GO:0070062	extracellular exosome	CC	8,2E-07
GO:0005887	integral component of plasma membrane	CC	1,1E-06
GO:0007588	excretion	BP	1,9E-06
GO:0005886	plasma membrane	CC	2,3E-06
GO:0035556	intracellular signal transduction	BP	8,9E-06
GO:0005515	protein binding	MF	1,6E-05
GO:0034220	ion transmembrane transport	BP	1,7E-05
GO:1902600	proton transmembrane transport	BP	3,1E-05
GO:0006885	regulation of pH	BP	3,8E-05
GO:0016324	apical plasma membrane	CC	4,8E-05
GO:0016471	vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex	CC	6,2E-05
GO:0043025	neuronal cell body	CC	6,4E-05
GO:0014850	response to muscle activity	BP	7,7E-05
GO:0006833	water transport	BP	8,4E-05
GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	BP	0,00013
GO:0007568	aging	BP	0,00014
GO:0090383	phagosome acidification	BP	0,00015
GO:0005615	extracellular space	CC	0,00021
GO:0015991	ATP hydrolysis coupled proton transport	BP	0,00022
GO:0071805	potassium ion transmembrane transport	BP	0,00026
GO:0031640	killing of cells of other organism	BP	0,0003
GO:0033572	transferrin transport	BP	0,00031
GO:0030521	androgen receptor signaling pathway	BP	0,00039
GO:0042752	regulation of circadian rhythm	BP	0,00048
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process	BP	0,00054

## Liite 6

### Walktrap\_3

GOID	TERM	ONTOLOGY	P_Value
GO:0005515	protein binding	MF	9,9E-53
GO:0005829	cytosol	CC	3,5E-34
GO:0051301	cell division	BP	9,4E-31
GO:0005634	nucleus	CC	4,3E-25
GO:0005654	nucleoplasm	CC	9,4E-22
GO:0008283	cell proliferation	BP	2,2E-21
GO:0005524	ATP binding	MF	6,3E-21
GO:0007062	sister chromatid cohesion	BP	3,8E-20
GO:0000278	mitotic cell cycle	BP	1,4E-19
GO:0005737	cytoplasm	CC	7,2E-18
GO:0000776	kinetochore	CC	1,4E-16
GO:0030496	midbody	CC	2,1E-16
GO:0005813	centrosome	CC	1,2E-15
GO:0005871	kinesin complex	CC	2,1E-14
GO:0007059	chromosome segregation	BP	1,4E-13
GO:0008017	microtubule binding	MF	4E-13
GO:0003777	microtubule motor activity	MF	7,2E-13
GO:0000922	spindle pole	CC	1,4E-12
GO:0005819	spindle	CC	1,6E-12
GO:0005876	spindle microtubule	CC	1,8E-12
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	CC	1,8E-12
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	BP	7,2E-12
GO:0007018	microtubule-based movement	BP	9,4E-12
GO:0016887	ATPase activity	MF	2,6E-11
GO:0016020	membrane	CC	2,6E-11

## Liite 7

### Walktrap\_4

GOID	TERM	ONTOLOGY	P_Value
GO:0005515	protein binding	MF	4,8E-40
GO:0005576	extracellular region	CC	1,2E-39
GO:0005886	plasma membrane	CC	1,2E-30
GO:0006955	immune response	BP	1,3E-30
GO:0006954	inflammatory response	BP	1,1E-27
GO:0005615	extracellular space	CC	3,4E-27
GO:0005737	cytoplasm	CC	3,3E-26
GO:0070062	extracellular exosome	CC	3,3E-26
GO:0051607	defense response to virus	BP	6,2E-23
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	BP	8,6E-20
GO:0005887	integral component of plasma membrane	CC	2,3E-19
GO:0005829	cytosol	CC	2,4E-19
GO:0009615	response to virus	BP	4,4E-19
GO:0045087	innate immune response	BP	1,1E-18
GO:0060337	type I interferon signaling pathway	BP	2,2E-18
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	BP	5,3E-17
GO:0016021	integral component of membrane	CC	8,9E-17
GO:0070268	cornification	BP	4,2E-16
GO:0001533	cornified envelope	CC	1,2E-14
GO:0030216	keratinocyte differentiation	BP	7,7E-14
GO:0005509	calcium ion binding	MF	8,5E-14
GO:0045071	negative regulation of viral genome replication	BP	2E-13
GO:0043312	neutrophil degranulation	BP	5,4E-13
GO:0018149	peptide cross-linking	BP	6E-13
GO:0005198	structural molecule activity	MF	7,2E-13